



TUGAS AKHIR - SB141510

PROFIL EKSPRESI GEN DALAM BIOSINTESIS FITOHORMON BEBERAPA VARIETAS TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum*) PADA KONDISI TERCEKAM KEKERINGAN

Erlyta Vivi Permatasari
NRP. 1513 100 058

Dosen Pembimbing
Dr. Nurul Jadid, M.Sc.
NIP. 19820512 200501 1 002

DEPARTEMEN BIOLOGI
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2017



TUGAS AKHIR - SB141510

**PROFIL EKSPRESI GEN DALAM BIOSINTESIS
FITOHORMON BEBERAPA VARIETAS TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum*) PADA KONDISI TERCEKAM
KEKERINGAN**

**Erlyta Vivi Permatasari
NRP. 1513 100 058**

**Dosen Pembimbing
Dr. Nurul Jadid, M.Sc.
NIP. 19820512 200501 1 002**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2017**



FINAL PROJECT - SB141510

PROFILE OF PHYTOHORMONE BIOSYNTHETIC GENE EXPRESSION OF SOME TOBACCO (*Nicotiana tabacum*) VARIETIES DURING DROUGHT STRESS

**Erlyta Vivi Permatasari
NRP. 1513 100 058**

**Advisor Lecturer
Dr. Nurul Jadid, M.Sc.
NIP. 19820512 200501 1 002**

**Department of Biology
Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2017**

LEMBAR PENGESAHAN

PROFIL EKSPRESI GEN DALAM BIOSINTESIS FITOHORMON BEBERAPA VARIETAS TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum*) PADA KONDISI TERCEKAM KEKERINGAN

TUGAS AKHIR

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar
Sarjana Sains pada Jurusan S-1 Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :

**ERLYTA VIVI PERMATASARI
NRP. 1513 100 058**

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir:

Dr. Nurul Jadid, M.Sc.(Pembimbing 1)

Surabaya, 23 Maret 2017

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Dr. Dewi Hidayati, S.Si., M.Si
NIP. 19691121 199802 2 001



**PROFIL EKSPRESI GEN DALAM BIOSINTESIS
FITOHORMON BEBERAPA VARIETAS TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum*) PADA KONDISI TERCEKAM
KEKERINGAN**

Nama Mahasiswa : Erlyta Vivi Permatasari
NRP : 1513 100 058
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. Nurul Jadid, M.Sc.

Abstrak

Kekeringan merupakan masalah dunia yang menjadi faktor pembatas dalam budidaya tembakau, salah satu mekanisme pertahanan terhadap kondisi tersebut adalah regulasi sintesis fitohormon. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui profil ekspresi gen-gen dalam biosintesis fitohormon (NtGA3ox1, NtACO, NtAOS, dan NtICS) beberapa varietas tembakau (Var. Marakot, Japon Mawar, dan MKY) pada kondisi tercekam kekeringan. Sampel didapatkan dari penelitian Estiasih (2016) dengan perlakuan PEG 0% dan 30% secara in vitro. Ekspresi gen-gen tersebut kemudian dianalisa secara deskriptif kuantitatif menggunakan quantitative Real Time PCR (qRT-PCR).

Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa gen NtACO mengalami peningkatan ekspresi pada varietas MKY, Japon Mawar, dan Marokot masing-masing 1.53, 1.01, dan 1.08, begitu pula pada ekspresi gen NtICS yang mengalami kenaikan masing-masing 2.01, 1.74, dan 1.64 kali dibandingkan dengan kontrol. Berbeda dengan ekspresi NtAOS yang menurun 0.62 kali pada var. Marokot dan meningkat 2.18 dan 4.74 pada var. Japon Mawar dan MKY. Sedangkan gen NtGA3ox justru menunjukkan tren penurunan ekspresi pada varietas uji Marakot, Japon Mawar, dan MKY masing-masing 0.36, 0.83, dan 0.78 kali dibandingkan kontrol. Maka berdasarkan hasil yang didapatkan,

genotip dapat mempengaruhi hasil ekspresi dari gen (NtACO, NtGA3ox, NtICS, dan NtAOS).

Kata kunci : kekeringan, Nicotiana tabacum, NtACO1, NtAOS, NtGA3ox, NtICS1.

PROFILE OF PHYTOHORMONE BIOSYNTHETIC GENE EXPRESSION OF SOME TOBACCO (*Nicotiana tabacum*) VARIETIES DURING DROUGHT STRESS

Name : Erlyta Vivi Permatasari
NRP : 1513 100 058
Department : Biology
Advisor Lecturer : Dr. Nurul Jadid, M.Sc.

Abstract

Drought is one of global problems which is becoming a limiting factor on tobacco cultivation. one of the defense mechanisms against these conditions is the regulation of the synthesis of phytohormones. Therefore, This study aims to elucidate the profil of phytohormone biosynthetic genes expression of some tobacco varieties, including var MKY, Marakot and Jepon Mawar, during drought stress. Samples are obtained from Estiasih's (2016) research which previously treated with Polyethylen Glycol (PEG) in vitro (0% and 30%). Expression of these genes then analyzed quantitative-descriptively using quantitative Real Time PCR (qRT-PCR).

The results showed that the expression of NtACO on var. MKY, Jepon Mawar, and Marokot increased respectively 1,53 and 1.01, and 1.08 fold, so as the expression of NtICS gene 2.01, 1.74, and 1.64 fold compared to the control. In contrast, expression of NtAOS gene decreased 0.62 fold on var. Marokot and increased 2,18 and 4,74 on var. Jepon Mawar and MKY. While NtGA3ox gene expression showed a downward trend in both varieties of Marakot, Jepon Mawar, and MKY respectively 0,36, 0,83, and 0,78 fold compared to the control. Finally based on the result obtained, genotype could affect genes expressions (NtACO, NtGA3ox, NtICS, and NtAOS).

Keywords: *Drought*, *Nicotiana tabacum*, NtACO1, NtAOS, NtGA3ox, NtICS1.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas berkat dan karunianya yang telah diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul “Profil Ekspresi Gen dalam Biosintesis Fitohormon Beberapa Varietas Tembakau (*Nicotiana tabacum*) pada Kondisi Tercekam Kekeringan”, sebagai salah satu syarat kelulusan Tugas Akhir pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Dalam melakukan studi literatur penelitian dan penyusunan laporan, penulis tidak lepas dari bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Penulis mengucapkan terimakasih kepada kedua orang tua, Bapak Teddy Saleh dan Ibu Supriati yang tidak lelah mendoakan, menyemangati, dan membimbing penulis, kepada Bapak Dr. Nurul Jadid, M.Sc. selaku dosen pembimbing yang senantiasa mendampingi dan memberikan banyak sekali ilmu dan waktunya, serta dosen penguji, Ibu Indah Trisnawati D.T M.Si., Ph.D. dan Ibu Dini Ermavitalini, S.Si., M.Si. yang telah meluangkan waktu dan memberikan masukan, juga kepada teman-teman yang telah membantu dan menyemangati dalam proses pengerjaan tugas akhir penulis.

Surabaya, 23 Maret 2017

Erlyta Vivi Permatasari

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
Abstrak	iv
<i>Abstract</i>	vi
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Permasalahan	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan	4
1.5 Manfaat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Tembakau (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	5
2.2. Cekaman Kekeringan.....	11
2.3. Hormon	15
2.3.1. Giberelin.....	16
2.3.2. Etilen	20
2.3.3. Asam Jasmonat	23

2.3.4. Asam Salisilat	25
2.4. <i>Housekeeping Gene</i>	27
2.5. Polymerase Chain Reaction(PCR)	27
 BAB III METODOLOGI	 31
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	31
3.2 Metode Pelaksanaan	31
3.2.1 Preparasi Sampel.....	31
3.2.2 Preparasi Primer	31
3.2.3 Analisa Ekspresi Gen	32
3.3 Analisa Hasil PCR <i>Real Time</i>	35
3.4 Rancangan Penelitian dan Analisa Data.....	36
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	 37
4.1.1 <i>NtACO</i>	39
4.1.2 <i>NtGA3ox1</i>	41
4.1.3 <i>NtICS</i>	43
4.1.4 <i>NtAOS</i>	44
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	 49
5.1 Kesimpulan.....	49
5.2 Saran	49
 DAFTAR PUSTAKA.....	 51
LAMPIRAN	69

BIODATA PENULIS.....	91
----------------------	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Tanaman Tembakau.	5
Gambar 2. 2. Tembakau varietas Marokot	9
Gambar 2. 3. Tembakau varietas Jepon Mawar	10
Gambar 2. 4. Tembakau varietas MKY.....	11
Gambar 2. 5. Bioaktif GA1 dan GA3.....	16
Gambar 2. 6. Biosintesis Giberelin	18
Gambar 2. 7. Lokasi jalur biosintesis giberelin.....	19
Gambar 2. 8. Struktur kimia etilen	20
Gambar 2. 9. Jalur biosintesis etilen.....	21
Gambar 2. 10. Biosintesis Jasmonat.....	24
Gambar 2. 11. Biosintesis Asam Salisilat	26
Gambar 4. 1 Ekspresi mRNA relatif gen <i>NtACO</i>	39
Gambar 4. 2 Model pengaruh kekeringan terhadap penuaan.	40
Gambar 4. 3 Ekspresi mRNA relatif gen <i>NtGA3ox</i>	42
Gambar 4. 4 Ekspresi mRNA relatif gen <i>NtICS</i>	43
Gambar 4. 5 Ekspresi mRNA relatif gen <i>NtAOS</i>	45
Gambar 4. 6. Model keterkaitan asam jasmonat terhadap VSP ..	46

DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1. Pasangan spesifik <i>primer forward</i> dan <i>reverse</i>	32
Tabel 3. 2. Komponen PCR	34
Tabel 3. 3. Kondisi PCR.....	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Spesifikasi Primer	69
Lampiran 2. Sekuens Gen	71
Lampiran 3. Pengenceran Primer	83
Lampiran 4. Hasil Optimasi	85

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kekeringan merupakan masalah dunia dan memiliki pengaruh utama terhadap lahan pertanian dan perkebunan. Kekurangan air, suhu yang ekstrem, kelembaban yang rendah, dan perubahan iklim menjadi penyebab dari kekeringan (Hamayun *et al.*, 2010). Perubahan iklim sebagai akibat dari pemanasan global dapat menimbulkan dampak terhadap produksi pertanian dan perkebunan baik secara langsung dan tidak langsung. Kenaikan suhu yang ekstrim berpengaruh terhadap menurunnya produktivitas tanaman serta meningkatnya resiko kegagalan panen, sedangkan dampak tidak langsung dapat meliputi munculnya penyakit baru, berkurangnya pasokan air irigasi, dan lain sebagainya (Soeparno *et al.*, 2013).

Cekaman abiotik seperti kekeringan menjadi ancaman bagi tanaman dan memberikan berbagai dampak negatif bagi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Meskipun demikian, tanaman memiliki mekanisme pertahanan yang sangat kompleks dalam merespon kondisi tercekam tersebut. Respon tanaman dapat berupa fisioanatomi maupun molekuler, seperti penghambatan proses pemanjangan sel, hilangnya tekanan turgor, gangguan fotoasimilasi, mitosis (Farooq *et al.*, 2008), penutupan stomata, pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) (Zarei *et al.*, 2012; Shehab *et al.*, 2010), dan pembentukan lapisan lilin pada epidermis (Cameron *et al.*, 2006). Selain itu, cekaman kekeringan juga berakibat pada penurunan kemampuan untuk bergerminasi dan tumbuh (Harris *et al.*, 2002), berkurangnya biomassa tanaman (Zeid dan Shedeed, 2006), mereduksi kemampuan dalam proses pembungaan dan reproduksi (Kawakami *et al.*, 2006; Mazahery-laghab *et al.*, 2003; Samarah, 2005).

Tembakau merupakan salah satu komoditas perkebunan penting di Indonesia dengan produksi utama berupa rokok. Tidak terbatas pada hal tersebut, penggunaan tembakau tersebar

diberbagai bidang termasuk dibidang farmasi sebagai antijamur (Sela-Buurlage *et al.*, 1993), antimikroba (Barkht dan Shafi, 2012), bahkan *treatment* terhadap Alzheimer (Ksir dan Benson, 1983, Wilso *et al.*, 1995). Beberapa daerah di Indonesia yang merupakan sentra perkebunan tembakau dilaporkan mengalami dampak yang cukup parah akibat cekaman kekeringan. Dampak tersebut ditunjukkan dengan menurunnya produksi tembakau hingga 50% (Enjang, 2011) dan kerugian gagal panen hingga 300 milyar (Sucahyono, 2013). Mekanisme respon dan regulasi tanaman tembakau terhadap cekaman kekeringan dipengaruhi salah satunya oleh faktor genotip. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa jenis varietas memberikan respon yang berbeda terhadap cekaman kekeringan. Effendi (2008) menyatakan dalam penelitiannya bahwa varietas Towuti beras menunjukkan sifat ketahanan terbaik terhadap cekaman kekeringan dibandingkan varietas Gajah Mungkur, Situ Patenggang, dan Kalimutu. Disisi lain, Estiasih (2016) juga menyimpulkan bahwa setiap varietas pada tanaman tembakau menunjukkan profil ekspresi yang berbeda pada perlakuan yang sama dengan cekaman kekeringan berupa PEG berbagai konsentrasi karena adanya pengaruh faktor genotip yang ditunjukkan dengan nilai ekspresi mRNA relatif *ERD10B* lebih tinggi yakni 1.64 kali lipat pada varietas MKY dibandingkan 1.35 kali lipat dari varietas Jepon Mawar yang dibandingkan dengan kontrol, dimana ekspresi tertinggi terlihat pada penambahan PEG 30%.

Modulasi transkripsi menjadi salah satu faktor utama dalam mekanisme pengaturan respon terhadap cekaman kekeringan (Jia *et al.*, 2015), peran fitohormon dalam mekanisme respon tanaman terhadap cekaman baik biotik maupun abiotik memberikan peran yang penting. Sintesa dan komunikasi antar fitohormon pada saat tanaman mengalami cekaman memiliki kompleksitas yang tinggi (Hedden dan Thomas, 2006), interaksi pengaruh cekaman tersebut terhadap regulasi hormon melibatkan ekspresi gen-gen

penting dalam biosintesis dan mekanisme transportasi hormonal (Davies, 2004).

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa sejumlah gen digunakan sebagai *marker* dalam biosintesis fitohormon. Beberapa gen tersebut diantaranya *NtGA3ox* (*Gibberellin 3-oxydase 2*) pada biosintesis giberelin (Gallego-Giraldo *et al.*, 2008), *Nt-ACO1* (*ACC Oxydase*) dalam biosintesis hormon etilen (Lai *et al.*, 2014), *NtAOS* (*Allene oxide synthase*) dalam biosintesis asam jasmonat, *NtICS1* (*Isochorismate synthase 1*) pada biosintesis asam salisilat (Ghanta *et al.*, 2013). Penelitian berkaitan dengan profil ekspresi gen yang terlibat dalam biosintesis fitohormon pada tanaman yang tercekam kekeringan masih jarang dilakukan, utamanya pada beberapa varietas tembakau tipe burley yang banyak dikembangkan di Indonesia. Beberapa penelitian yang telah dilakukan mengenai pengaruh kekeringan terhadap tembakau terbatas pada karakter fisiologis (Djumali dan Mulyaningsih, 2013), viabilitas benih (Yuliana, 2010), dan profil protein (Dewi *et al.*, 2015).

Berdasarkan informasi tersebut, profil ekspresi dari gen-gen yang terlibat dalam biosintesis fitohormon berupa *NtGA3ox*, *NtACO*, *NtAOS*, dan *NtICS* terhadap cekaman kekeringan sangat penting dilakukan untuk melihat pola respon yang diberikan tiga varietas yang berbeda dari tembakau tipe *Burley* yakni Jepon Mawar, MKY, dan Marokot.

1.2 Rumusan Permasalahan

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana profil ekspresi gen yang terlibat dalam biosintesis giberelin, etilen, asam jasmonat, dan asam salisilat akibat cekaman kekeringan pada *Nicotiana tabacum* tipe *Burley* (Varietas Jepon Mawar, MKY, dan Marokot) dalam medium kultur *in vitro*.

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah :

- Tembakau yang digunakan berasal dari 3 macam varietas, yakni Marokot, Jepon Mawar, dan MKY.
- Sampel yang digunakan berupa hasil kultur *in vitro* tanaman tembakau varietas Marokot, Jepon Mawar, dan MKY oleh Estiasih (2016) yang diberi perlakuan cekaman kekeringan berupa pemberian PEG 6000 dalam media kultur *in vitro* dengan konsentrasi 0% sebagai kontrol dan 30% selama 1 minggu.
- Analisa ekspresi gen dilakukan secara kuantitatif menggunakan qRT-PCR (*Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*).
- Gen-gen yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *NtGA3ox*, *NtACO*, *NtICS*, dan *NtAOS*.
- Gen yang digunakan sebagai kontrol internal adalah *NtEF-1 α* .

1.4 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil ekspresi gen yang terlibat dalam biosintesis hormon giberelin, etilen, asam jasmonat, dan asam salisilat akibat cekaman kekeringan pada *Nicotiana tabacum* tipe *Burley* (Varietas Jepon Mawar, MKY, dan Marokot) dalam medium kultur *in vitro*.

1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai profil ekspresi gen-gen yang terlibat dalam biosintesis fitohormon akibat cekaman kekeringan pada *Nicotiana tabacum* tipe *Burley* (varietas Jepon Mawar, Marakot, dan MKY), sehingga dari informasi tersebut dapat diketahui regulasi mekanisme pertahanan berdasarkan perubahan ekspresi gen beberapa varietas tembakau terhadap cekaman kekeringan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tembakau (*Nicotiana tabacum*)

Tembakau merupakan tanaman asli Amerika, namun seiring berjalannya waktu tembakau kini telah dikomersialkan hingga hampir ke seluruh dunia (Kishore, 2014). Tembakau merupakan salah satu komoditi utama di Jawa Timur yang memiliki peran penting dalam pembangunan ekonomi regional maupun nasional (Disbun Prov Jatim, 2012).



Gambar 2. 1. Tanaman Tembakau. (a. Daun; b. Bunga; c. biji) (Kishore, 2014).

Menurut Tjitrosoepomo (2000), tanaman tembakau memiliki morfologi berupa semak, tegak, sedikit bercabang dan mempunyai tinggi 0,5-2,5 meter. Daun tunggal, bertangkai pendek, memanjang, atau berbentuk lanset, akuminatus, sebagian memeluk batang dan ujung runcing. Kelopak bunga berbentuk tabung, yang memanjang tidak sama. Tabung bunga jantan 4 cm panjangnya dan berbentuk bintang, bertaju 5 dan runcing. Benang sari bebas, yang sebuah lebih pendek dari yang lainnya dan buah berbentuk telur memanjang. Tembakau memiliki biji yang kecil dan juga banyak (Gambar 2.1).

Kriteria mutu yang dinilai pada tembakau meliputi warna dan tingkat kecerahan berdasarkan pengamatan visual. Warna dari tembakau harus cukup cerah dan semakin tingginya kecerahan berbanding lurus dengan mutu. Aroma dari tembakau juga menjadi salah satu tolok ukur kriteria level tembakau, semakin tinggi mutu tembakau aroma yang dihasilkan akan semakin harum, gurih, dan manis (Disbun, 2007).

Tembakau *burley* di Indonesia merupakan tembakau introduksi yang mulai diusahakan sejak tahun 1957 dan tergolong dalam kelas *light air cured tobacco*. Semula tembakau ini digunakan untuk campuran rokok putih, terutama rokok racikan Amerika (*American Blend*), dengan proporsi $\pm 20\%$. Kini beberapa merk rokok kretek juga menggunakan tembakau *burley*, walaupun komposisinya lebih sedikit dibandingkan rokok putih (Rochman *et al.*, 2006).

Tembakau *burley* memiliki kandungan minyak yang tinggi, rendah gula, nikotin tinggi, dan rasa seperti kacang (Geiss, 2007). Menurut Sasscer dan Bowman (1998) panjang daun tembakau *burley* berkisar 70.5 cm – 76.7 cm dengan lebar 32.3-36 cm. Tembakau *Burley* bercirikan warna daun hijau pucat, batang dan ibu tulang daun berwarna putih krem, daun tergolong ukuran besar (90– 160 cm^2), dan tinggi tanaman sekitar 180 cm (Susilowati, 2006). Susunan kimia dari daun tembakau *Burley* disajikan dalam tabel berikut.

No	Uraian	Jumlah %
1	Abu	20
2	Gula	0,4 - 2,5
3	Fenol	0,0 - 0,5
4	Nitrat	1,0 - 2,0
5	Nikotin	
	a. Pada daun bawah	0,16 - 2,89
	b. Pada daun tengah	0,3 – 3,75
	c. Pada daun atas	0,5 - 4,0
6	Kandungan N total	2,18 - 3,58

Tabel 1. Komponen kimia tembakau tipe Burley
Sumber : Cahyono, 1998

Penyakit yang muncul pada varietas tembakau *burley* adalah penyakit-penyakit yang sering dijumpai pada pertanaman tembakau di Indonesia seperti Mosaik, TEV, TLCV, lanas (*Phytophthora nicotianae*) dan nematoda *Meloidogyne* spp. dengan tingkat serangan rendah (Rochman *et al.*, 2006).

2.1.1. Klasifikasi Taksonomi

Regnum : Plantae, Eudicots, Asterids
 Divisio : Magnoliophyta
 Classis : Magnoliopsida
 Ordo : Solanales
 Famila : Solanaceae
 Genus : *Nicotiana*
 Species : *Nicotiana tabacum*
 Nama umum : Fumo, Petume, Petina, Pitura, Etum, Tabaco, Tobacco, Tabaci Folia.
 Sinonim : Tabacca, Tabaci Folia, Tobacco, Tamak, Siah (Marma).

Habitat : Virginia, Amerika, China, Turki, Yunani, Belanda, Prancis, Jerman dan kebanyakan negara sub-tropis.

(Kishore, 2014)

2.1.2. Varietas Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Burley

Tembakau tipe Burley diantaranya terdapat 3 varietas, yakni Marakot, Japon Mawar, dan MKY.

a. Varietas Marakot

Varietas Marakot memiliki area penanaman di daerah Jember (Kalisat, Ledokombo, Sukowono) dan Bondowoso (Tamanan). Adaptasi agroekologi sebagian besar ditanam di sawah dengan tipe tanah Regosol, Latosol, dan Litosol. Varietas ini memiliki tinggi sedang sekitar 130,0 cm (111,3 cm – 148,7 cm). Batang berwarna hijau kekuningan dan berbulu, berdiameter 2,31 cm (1,89 cm – 2,73 cm). Daun berjumlah sedikit sekitar 17 lembar (13 lembar – 20 lembar), panjangnya 55,0 cm (52,4 cm – 57,6 cm), lebarnya 27,8 cm (25,1 cm – 30,6 cm) berbentuk bulat memanjang, dan bertepi berombak. (PT. Sadhana, 2015).



Gambar 2. 2. Tembakau Marokot (Sadhana, 2015).

b. Varietas Jepon Mawar

Varietas Jepon Mawar memiliki tinggi sedang sekitar 134,7 cm (antara 119,6 cm – 149,8 cm). Batang berwarna hijau kekuningan dan berbulu, berdiameter 2,90 cm (2,78 cm – 3,02 cm). Daun berjumlah sedang yaitu berkisar 23 lembar (20 lembar – 26 lembar), panjangnya 62,5 cm (antara 48,3 cm – 77,0 cm), lebarnya 36,8 cm (antara 31,2 cm – 42,5 cm) berbentuk bulat memanjang, dan bertepi licin/rata (PT. Sadhana, 2015).



Gambar 2. 3. Tembakau varietas Jepon Mawar (Sadhana, 2015).

c. Varietas MKY

Varietas ini memiliki tinggi 207,0 cm (180,3 cm – 233,7 cm). Batang berwarna hijau dan berbulu, berdiameter 2,72 cm (2,19 cm – 3,25 cm). Daun berjumlah sedang yaitu 25 lembar (20 – 30 lembar), panjangnya 57,2 cm (51,0 cm – 63,3 cm), lebarnya 32,3 cm (26,1 cm – 39,0 cm) berbentuk ovate, dan tepi berombak. (PT. Sadhana, 2015).



Gambar 2. 4. Tembakau varietas MKY (Sadhana, 2015).

2.2. Cekaman Kekeringan

Cekaman kekeringan merupakan istilah untuk menyatakan bahwa tanaman mengalami kekurangan air akibat keterbatasan air dari lingkungannya yaitu media tanam. Menurut Levit (1980) dan Jaleel *et al* (2009) cekaman kekeringan pada tanaman dapat disebabkan kekurangan suplai air di daerah perakaran dan permintaan air yang berlebihan oleh daun akibat laju evapotransporasi melebihi laju absorpsi air walaupun keadaan air tanah tersedia cukup. Rendahnya ketersediaan air menyebabkan suplai air di daerah perakaran semakin berkurang sehingga menghambat proses penyerapan air oleh akar tanaman karena potensial air dalam tubuh tanaman. Pada saat terjadi kekeringan, sebagian stomata daun menutup sehingga terjadi hambatan masuknya CO_2 dan menurunkan aktivitas fotosintesis. Selain menghambat aktivitas fotosintesis, cekaman kekeringan juga menghambat sintesis protein dan dinding sel (Salisbury and

Ross, 1995). Pengaruh cekaman kekeringan tidak saja menekan pertumbuhan dan hasil bahkan menjadi penyebab kematian tanaman.

Parameter yang nampak pada kondisi kekeringan dapat dilihat pada fase pertumbuhan vegetatifnya yaitu ukuran daun yang kecil, berkurangnya diameter batang dan bobot tanaman (Budianto *et al.*, 1998). Cekaman kekeringan pada fase generatif (pembungaan dan pengisian polong) dapat menyebabkan gugurnya bunga sehingga tidak terbentuk polong muda. Kekurangan air pada saat pengisian polong menyebabkan penurunan berat biji kering (Pasaribu dan Sunarlim, 1998).

2.2.1. Polietilen glikol

Polietilen glikol (PEG), merupakan polimer aktif yang biasa digunakan untuk megondisikan tanaman dalam keadaan kekurangan air dengan menurunkan potensial air dari media pertumbuhan (Krzek, 1985). Polietilen glikol adalah polimer yang dapat dirumuskan oleh formula $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$. Nilai n dapat berkisar dari 1 sampai nilai yang sangat besar, karena itu berat molekul dari PEG ini dapat berkisar antara 150- 10.000. Senyawa yang memiliki berat molekul dari 150-700 berbentuk cairan, dimana senyawa yang berat molekulnya 1.000-10.000 berbentuk padatan. Senyawa glikol dengan berat molekul yang rendah biasanya digunakan untuk larutan kental dimana campuran glikol ini biasanya dimanfaatkan sebagai basis salep larut air (Grosser, *et al.*, 2011). Polietilen glikol yang memiliki molekul besar tidak dapat masuk ke jaringan tanaman. Polietilen glikol bersifat polar, sehingga mampu mengikat air dan menyebabkan potensial air menurun, dengan demikian meskipun ketersediaan air dalam media tetap ada tetapi tanaman tidak mampu memperoleh air dalam media tersebut. Molekul polietilen glikol bersifat inert, non-ionik, dan hampir kedap membran sel

dan dapat menginduksi cekaman air secara seragam tanpa menyebabkan kerusakan fisiologis secara langsung (Ghebremariam *et al.*, 2013). PEG menstimulasi cekaman kekeringan pada kultur sel tumbuhan mirip dengan yang terjadi pada sel tumbuhan utuh. Menurut Graham (1992) dalam Aulia (2005), interaksi PEG dan air terjadi melalui ikatan hidrogen antara molekul air dengan kelompok eter dari polimer. Senyawa PEG dapat menurunkan potensial osmotik larutan melalui aktivitas matriks sub-unit etilena oksida yang mampu mengikat molekul air dengan ikatan hidrogen sehingga dapat mengondisikan cekaman kekeringan.

Penggunaan PEG sebagai salah satu senyawa representasi cekaman kekeringan telah banyak digunakan, salah satunya oleh Estiasih (2016) dalam penelitiannya dengan 4 varian konsentrasi PEG 6000, antara lain 0%, 10%, 20%, dan 30% untuk melihat perubahan ekspresi gen-gen responsif terhadap cekaman kekeringan, penggunaan PEG dengan konsentrasi paling tinggi memberikan respon berupa tingginya ekspresi mRNA relatif gen *NtERD* sebagai gen di garis pertahanan pertama terhadap cekaman kekeringan (Alves dan Luciano, 2012) sebesar 1.64 kali lipat pada varietas MKY, sedangkan pada konsentrasi 10% dan 20% ekspresi relatif 1.17 dan 1.13 kali lipat. Hal yang sama juga terjadi pada peningkatan ekspresi mRNA relatif gen *NtLTP1* yang berperan mentransfer fosfolipid (Yeats dan Jocelyn, 2008) pada varietas MKY dimana semakin tinggi konsentrasi PEG mencerminkan semakin tingginya cekaman kekeringan, hal tersebut dibuktikan dengan tingginya ekspresi relatif yakni 1.08, 1.21, dan 1.52 kali lipat dibandingkan dengan kontrol 0% PEG.

2.2.2. Respon Tanaman

Tanaman yang tercekam kekurangan air berkepanjangan mengakibatkan laju pertumbuhan terhambat sehingga ukuran dan

produksi lebih rendah dibandingkan dengan yang normal (Kramer, 1983). Tanaman akan memberikan beberapa mekanisme terkait cekaman kekeringan terjadi, pertama disebut sebagai *desiccation postponement* yakni kemampuan untuk mengatur hidrasi pada jaringan dan *desiccation tolerance* berupa kemampuan untuk tetap fungsional selama dehidrasi, dan ketiga *drought escape* yakni tanaman yang melengkapi siklus hidup mereka selama musim hujan, sebelum timbulnya kekeringan. Pada *desiccation postponer* air akan disimpan atau air akan dihabiskan. Penyimpan air akan menggunakan air secara konservatif, melestarikan beberapa di tanah untuk digunakan di akhir siklus hidup mereka, sedangkan air pemboros akan mengonsumsi air secara boros, contohnya *Prosopis sp.* tanaman ini telah menghancurkan semiarid di Barat Daya Amerika Serikat (Taiz *et al.*, 2002).

Beberapa strategi respon tanaman dilakukan dalam menghadapi cekaman kekeringan. Pada sel yang sedang tumbuh, air menciptakan *turgidity* sel, sehingga menampakkan bentuk dan strukturnya (Noggle dan Fritz, 1986). Pembesaran dan pembelahan sel hanya dapat terjadi pada tingkat turgiditas sel yang tinggi (Kramer, 1983). Cekaman air yang terjadi akan mempengaruhi membran sel dan menyebabkan turgor menurun dan selanjutnya menahan laju pembesaran sel. Pada tanaman yang toleran terhadap cekaman kekeringan terjadi mekanisme mempertahankan turgor agar tetap di atas nol sehingga potensial air jaringan tetap rendah dibandingkan potensial air eksternal sehingga tidak terjadi plasmolisis (Jones and Turner, 1980). Kemampuan mengontrol terhadap transpirasi juga merupakan salah satu mekanisme ketahanan tanaman terhadap adanya cekaman kekeringan. Selanjutnya dilaporkan pula bahwa ukuran daun yang kecil dan sukulen mengurangi laju kehilangan air melalui transpirasi (Farooq *et al.*, 2009).

Pembentukan ROS secara normal merupakan respon sinyal pertahanan awal tanaman secara biokimia terhadap cekaman kekeringan dan bertindak sebagai *messenger* sekunder untuk

memicu reaksi pertahanan berikutnya pada tanaman. ROS, yang terdiri dari ion oksigen, radikal bebas dan peroksida, terbentuk sebagai produk sampingan dari metabolisme normal oksigen dan memiliki peran penting dalam signaling sel. Akan tetapi, selama cekaman lingkungan seperti cekaman kekeringan, level ROS akan meningkat secara dramatis yang akan menyebabkan kerusakan oksidatif pada protein, DNA dan lipid. Karena sangat reaktif, ROS yang tinggi secara serius dapat merusak tanaman dengan meningkatkan peroksidasi lipid, degradasi protein, fragmentasi DNA dan akhirnya kematian sel (Khan *et al.*, 2015). Pada tanaman, terdapat sistem pertahanan pada cekaman oksidatif. Perlindungan ini cukup untuk menghindari cedera yang disebabkan oleh oksigen aktif, sehingga menjamin fungsi normal sel. Tanaman memiliki sistem antioksidan enzimatis yang mana keseimbangan antara produksi ROS dan kegiatan enzim antioksidan menentukan apakah signaling oksidatif dan/atau kerusakan akan terjadi.

Selain respon biokimia berkaitan dengan ROS, beberapa respon lain juga disebutkan oleh Taiz *et al* (2002) berupa pengurangan luas area dari daun, menstimulasi pengguguran daun, meningkatkan ekstensi akar, penutupan stomata sebagai respon dari sinyal asam absisat, dan meningkatkan deposisi lilin pada permukaan daun.

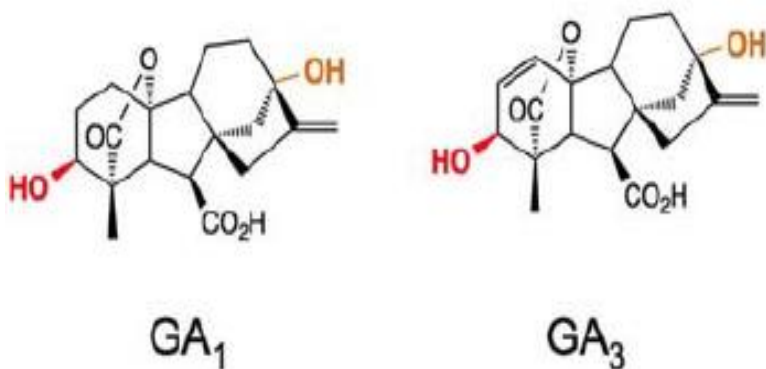
2.3. Hormon

Hormon tumbuhan merupakan kelompok yang secara alami terdapat pada tanaman, substansi organik yang mempengaruhi proses fisiologi pada konsentrasi yang rendah. Proses yang dipengaruhi antara lain pertumbuhan, diferensiasi, dan perkembangan (Davies, 2004). Hormon akan ditranspor ke bagian tertentu yakni tempat hormon berikatan ke suatu reseptor spesifik dan memicu respon-respon didalam sel-sel dan jaringan target. Setiap aspek pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan berada di bawah kontrol hormon hingga tingkat tertentu. Satu jenis hormon tunggal dapat meregulasi proses-proses selular dan

perkembangan yang sangat beraneka ragam. Sebaliknya, hormon-hormon ganda dapat mempengaruhi satu proses tunggal (Campbell *et al.*, 2005).

2.3.1. Giberelin

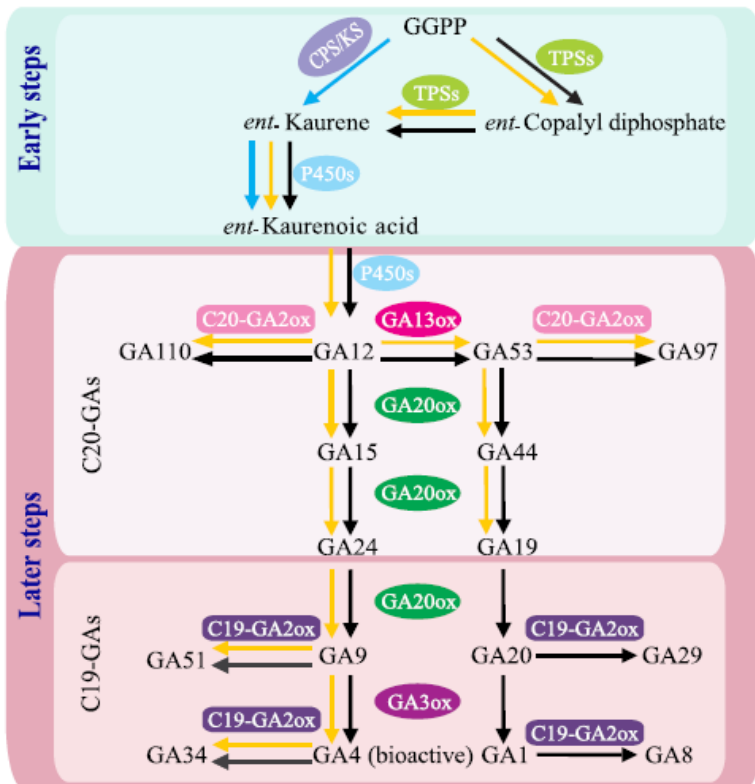
Giberelin (GAs), merupakan salah satu dari fitohormon penting, membentuk keluarga dari hormon diterpen yang terlibat dalam beberapa proses pertumbuhan dan perkembangan pada tumbuhan (Huang *et al.*, 2015). Giberelin (GAs) merupakan regulator alami dari pertumbuhan dan perkembangan tanaman melalui siklus hidup pada tanaman tingkat tinggi, termasuk perkecambahan biji, pemanjangan batang, dan pembungaan (Hedden, 1999). Terdapat hingga 125 anggota dari giberelin, sedangkan yang paling banyak ditemui adalah G3 yang merupakan asam giberelin dari jamur, dan giberelin yang paling penting berasal dari tumbuhan yaitu GA1. Pada beberapa tanaman GA1 merupakan pertumbuhan aktif utama dari giberelin, sedangkan GA lain tidak aktif pada bentuknya sebelum mengalami konversi menjadi GA1 (Davies, 2004).



Gambar 2. 5. Bioaktif GA1 dan GA3 (Sun, 2008)

Biosintesis GA pada tanaman tingkat tinggi dapat dibedakan menjadi 3 tahap: (i) biosintesis *ent*-kaurene dari geranyl geranyl

diphosphate (GGDP); (ii) konversi *ent*-kaurene menjadi GA12 melalui sitokrom P450 monooksigenase, dan (iii) formasi C20 dan C19 GA pada sitoplasma (Gambar 2.7). GGDP merupakan prekursor umum dari GA, karotenoid, dan klorofil. Kemudian diubah menjadi *ent*-kaurene, jalur intermediet pertama pada biosintesis GA, pada reaksi siklik 2 tahap, dikatalis oleh *ent*-kopalil difosfat sintase (CPS) dan *ent*-kauren sintase (KS). Pada proses selanjutnya, oksidasi bertahap untuk menghasilkan GA12 dengan dikatalis *ent*-kaurene oksidase (KO) dan *ent*-asam kaurenoid oksidase (KAO). Pada tahap ketiga, GA12 dapat dikonversi lebih lanjut menjadi GA53 oleh 13-hidroksilasi. GA12 dan GA53 kemudian diubah menjadi beberapa intermediet GA dan bioaktif GA, termasuk GA1 dan GA4, yang dikatalis oleh 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases, GA 20-oxidases (*GA20ox*) dan 3-oxidases (*GA3ox*) yang dapat dilihat pada gambar 2.7 (Sun, 2008). Jumlah giberelin perlu dalam keadaan yang cukup dan tidak berlebih karena dapat mempengaruhi kecepatan sintesis dan deaktivasinya, sehingga terdapat jalur pengubahan GA aktif tersebut yang dikatalis oleh GA2oksidase sehingga dapat menonaktifkan giberelin (Sun, 2008).

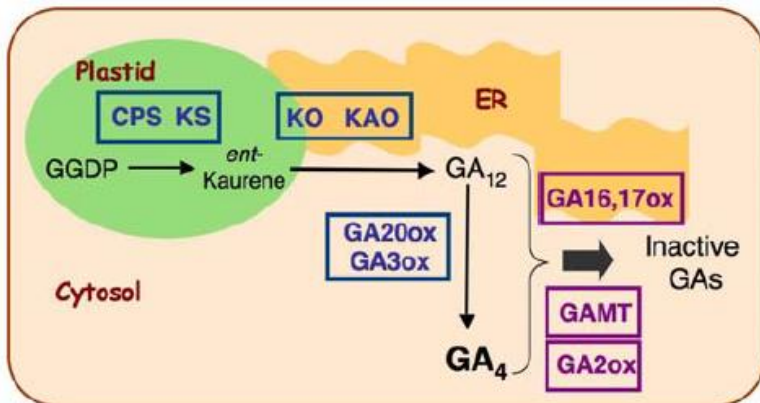


Gambar 2. 6. Biosintesis Giberelin (Huang *et al.*, 2015)

Pada jalur biosintesis ditinjau dari segi gen yang berperan dalam mengkode enzim berkaitan, CPS, KS, dan KO masing-masing dikode dari satu gen pada *Arabidopsis*, dan hampir seluruh tanaman yang telah diperiksa sebelumnya. Pola ekspresi dari KS hampir sama dengan CPS, namun secara keseluruhan jumlah mRNA KS lebih tinggi dibandingkan dengan CPS (Yamaguchi *et al.*, 1998). *GA20ox*, *GA3ox*, dan *GA2ox* masing-masing dikode oleh keluarga gen dan masing-masing memiliki pola spesifikasi pada jaringan yang berbeda. *GA3ox1*

diekspresikan pada semua tahap perkembangan, *GA3ox2* diekspresikan utamanya pada biji yang mengalami germinasi dan jaringan vegetatif. Kebalikannya, *GA3ox3* dan *GA3ox4* hanya diekspresikan pada bunga dan *siliques* (Sun, 2008).

Biosintesis GA dipisahkan menjadi kompartemen selular yang berbeda (Gambar 2.8). GGDP dalam biosintesis GA terutama berasal dari jalur metileritritol fosfat pada plastida, meskipun jalur sitoplasmik mevalonat juga memberikan kontribusi yang kecil (Kasahara *et al.*, 2002). Studi biokimia menunjukkan dua terpen sintase CPS dan KS terdapat pada stroma plastida, sedangkan KO terdapat pada permukaan luar dari pembungkus plastida, dimana KAO berasosiasi dengan retikulum endoplasma. *GA20ox*, *GA3ox*, dan *GA2ox* merupakan enzim yang larut dan diperkirakan terdapat pada sitoplasma. Oleh karena itu, hidrokarbon *ent*-kaurene disintesis di plastida oleh CPS dan KS kemudian ditransfer melalui pembungkus plastida untuk diubah menjadi *ent*-asam kaurenol oleh KO, kemudian menjadi GA₁₂ oleh KAO dan diubah menjadi aktif giberelin GA oleh *GA20ox* dan *GA3ox* disitoplasma seperti yang tampak pada gambar berikut.

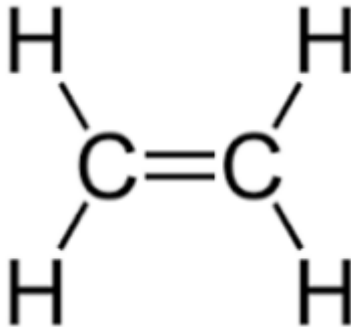


Gambar 2. 7. Lokasi jalur biosintesis dan katabolisme giberelin.

Berdasarkan penelitian lebih lanjut yang dilakukan oleh Gallego-Giraldo (2008), homeostasis giberelin dimediasi oleh gen biosintesis *GA20ox*, *GA3ox*, dan oleh gen katabolisme dari *GA2ox* (Gallego-Giraldo *et al.*, 2008)

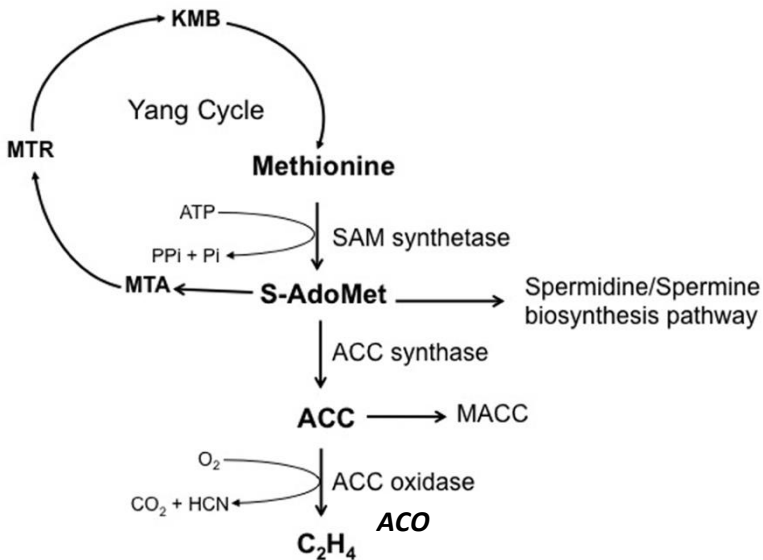
2.3.2. Etilen

Etilen merupakan hormon tumbuhan yang berasosiasi pada tanaman terhadap luka, serangan patogen, dan cekaman lain (Arshad and Frankenberger, 2002). Gas etilen (C_2H_4) disintesis dari metionin pada banyak jaringan sebagai respon terhadap stres (Davies, 2004). Hormon ini tidak terlihat esensial untuk pertumbuhan vegetatif dewasa secara normal, dibuktikan dengan tanaman transgenik dengan defisiensi etilen tetap dapat tumbuh secara normal. Namun meskipun begitu, tanaman tersebut tidak melakukan pembibitan dan penetrasi kedalam tanah, hal ini karena mereka kekurangan kemampuan penebalan pada batang dan pucuk sebagai respon adanya etilen, serta mereka akan rentan terhadap penyakit karena kekurangan respon resistensi induksi-etilen terhadap penyakit. Etilen disintesis secara natural oleh tumbuhan dan aktif pada konsentrasi rendah ($< 1\mu L.L^{-1}$) (Davies, 2004).



Gambar 2. 8. Struktur kimia etilen

Rumus kimia dari etilen terlihat pada gambar 2.9, karena struktur yang sederhana tersebut, beberapa komponen diajukan sebagai prekursor dari hormon ini, termasuk asam linoleat, propanal, beta-alanin, dan metionin (Lin, 2009). Penelitian membuktikan bahwa C3 dan C4 dari metionin diubah menjadi etilen, sedangkan C1 dan C2 akan bergabung menjadi CO_2 dan asam format (Davies, 2004). Metionin menjadi etilen melalui 3 kunci reaksi (i) metionin akan diubah menjadi S-AdoMet (S-adenosilmetionin) oleh S-AdoMet synthetase; (ii) ACC synthase (ACS) mengubah S-AdoMet menjadi ACC (1-aminocyclopropane-1 carboxylic acid), dan (iii) ACC oxydase (ACO) akan mendegradasi ACC untuk melepaskan etilen dan menginduksi transkripsi seperti yang tampak pada gambar berikut.



Gambar 2. 9. Jalur biosintesis etilen Modifikasi dari Arc et al (2013).

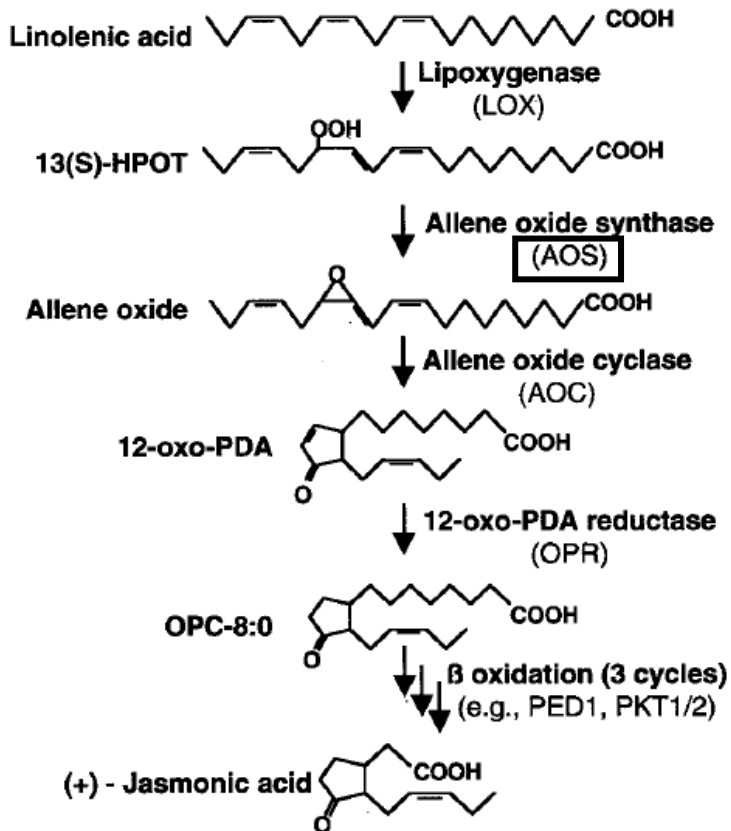
Konversi ACC menjadi etilen yang dikatalis oleh ACO merupakan *oxygen-dependent*, dan pada kondisi anaerob, formasi etilen akan ditekan. Pada reaksi ini Fe^{2+} dan oksigen dibutuhkan sebagai kofaktor dan kosubstrat. Terpisah dari ACC, ACS juga memproduksi 5'-metiltioadenosin (MTA), yang mana berfungsi dalam sintesis metionin baru, memastikan bahwa laju yang tinggi dari biosintesis etilen dapat di pertahankan meskipun jumlah metionin kecil. Gas beracun HCN terbentuk dari dekomposisi ACC kemudian didetosifikasi oleh beta-cyanoalanin sintase (Lin, 2009).

Oeller *et al* (1991) telah menggunakan antisense RNA dari ACC sintase untuk menghambat pemasakan buah tomat. Klee *et al.* (1991), dan Kende dan Zeevaart (1997) menyatakan bahwa tomat dengan transformasi antisense ACC sintase menurunkan sintesis etilen mencapai 99%, sedangkan ACC oksidase dengan orientasi antisense dari tomat menurunkan biosintesis etilen hingga 87%-90% (Hamilton *et al.*, 1990; Picton *et al.* 1993), hal yang serupa juga terjadi pada melon (Amor *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2002). Setiap enzim berperan dalam regulasi biosintesis etilen dan dikode oleh keluarga gen. Namun, berkebalikan dengan ACS, ACO berada konsentrasi yang lebih tinggi pada jaringan tanaman dalam membentuk etilen (Davies, 2004). Pada *Nicotiana tabacum*, sembilan ACS gen telah diidentifikasi sejauh ini antara lain *Nt-ACS1* hingga *Nt-ACS5* (Ge *et al.*, 2000), dan *Nt-ACS6* hingga *Nt-ACS9*. Cekaman pada tanaman berasosiasi meningkatkan produksi etilen dan berkorelasi dengan peningkatan ekspresi gen ACS dan ACO, pada tembakau contohnya, *NT-ACS1* diinduksi selama TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) karena xylanase, dan *NT-ACS2* diinduksi oleh beberapa cekaman lingkungan, sedangkan *NT-ACS3*, *NT-ACS4* dan *NT-ACS5* diinduksi oleh adanya luka (Ge *et al.*, 2000).

2.3.3. Asam Jasmonat

Biosintesis dari Asam jasmonat dan derivatnya berperan dalam pematangan buah, produksi viabel polen, pertumbuhan akar, sulur, serta ketahanan terhadap patogen dan serangga. Asam jasmonat dan metil ester (metil jasmonat, MeJA) merupakan asam linolenic yang berasal dari *cyclopentanone* yang banyak disebutkan dalam dunia tumbuhan. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa eksogenus JA atau MeJA dapat mendorong penuaan dan berperan dalam pengatur pertumbuhan (Creelman dan Mullet, 1997).

Biosintesis dari jasmonat dimulai dengan pelepasan asam α linolenic, asam lemak C18 poli-tak jenuh, yang berasal dari lipid membran plastida oleh lipase. Asam α linolenic ini kemudian diubah menjadi asam 13-hidroperoksilinolenic oleh 13 lipoksigenase (LOX), dan oleh allene oksida sintase (AOS) dikatalis untuk membentuk formasi asam 12,13-epoksilinolenic (Gambar 2.111). Asam 12,13-epoksilinolenic, produk dari AOS, secara cepat disiklisasi oleh enzim allene oksida siklase (AOC), menghasilkan asam 12-okso-cis-10, 15-fitodienoic (OPDA), turunan *cyclopentanone*. Tahap kedua dari biosintesis JA terjadi pada peroksisom, OPDA dari plastida akan ditransfer ke peroksisom untuk konversi metabolik selanjutnya. Di peroksisom, OPDA pertama-tama dikonversi menjadi asam 3-oxo-2-(cis-2'-pentenyl) cyclopentane-1-octanoic (OPC-8:0) oleh OPDA reduktase. OPC-8:0 diaktifkan oleh kasboksil-CoA ligase, yang dikode oleh OPCL1 pada *Arabidopsis*, dan diubah menjadi asam 7-isojasmonic dengan \square -oksidase sebanyak 3 kali. JA terbentuk dari *amide-linked* konjugasi dengan isoleusin dan asam amino lain untuk menghasilkan *jasmonoyl-isoleucine* dan jasmononil-asam amino lain. Pada *Arabidopsis* reaksi konjugasi ini dikatalis oleh enzim yang dikode oleh JAR1 (*Jasmonate Resistant1*) (Buchanan *et al.*, 2015).



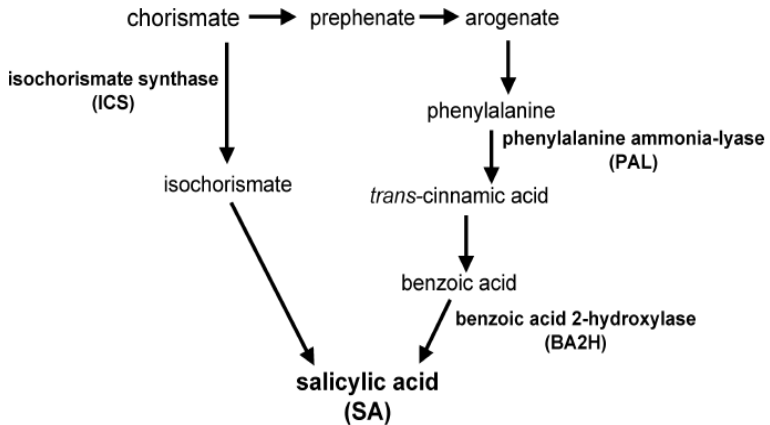
Gambar 2. 10. Biosintesis Jasmonat; Modifikasi dari He *et al.* (2002).

Allene oksida sintase (*AOS*) dan lipoxygenase (*LOX*) seperti yang telah dijelaskan sebelumnya dibutuhkan dalam biosintesis JA. Regulasi positif *feedback* pada transkripsi enzim yang dikode gen ini telah diketahui dan digunakan sebagai marker pada beberapa jenis tanaman. Pada *Arabidopsis*, ekspresi dari *AtAOS2* dan *AtLOX2* diregulasi oleh JA (Sato, 2013). Pada padi, induksi

OsAOS2 dan *OsLOX1* terdeteksi 6 jam setelah perlakuan JA. (Walia *et al.*, 2007).

2.3.4. Asam Salisilat

Asam salisilat merupakan senyawa yang terdiri atas 7 karbon, secara alami terjadi dari senyawa fenolik dan disintesis endogenus pada tanaman (Khan *et al.*, 2006). Asam salisilat disintesis melalui dua jalur dan kompartemen yang berbeda dengan prekursor yang berbeda pula. Jalur fenilpropanoid diinisiasi dari fenilalanin di sitoplasma, sedangkan jalur isokorismat terdapat di kloroplas (Vicente dan Plasencia, 2011). SA telah dikenali sebagai sinyal regulator yang memediasi respon tanaman terhadap cekaman biotik dan abiotik seperti kekeringan (Munne-Bosch dan Penuelas, 2003), dingin (Kang dan Saltveit, 2002), logam berat (Meetwally *et al.*, 2003), panas (Shi *et al.*, 2006), cekaman osmotik (Borsani *et al.*, 2001), dan respon sistemik mikroba patogen (Shah, 2003). Jalur asam sikimat secara sederhana mengubah prekursor karbohidrat dari proses glikolisis dan jalur pentosa fosfat menjadi asam amino aromatik termasuk prekursor SA, Fenilalanin (Herrmann and Weaver, 1999). Jalur paling umum dari biosintesis SA adalah dari jalur penilalanin. Bagaimanapun juga, biosintesis SA juga dapat dilalui melalui jalur isokorismat. Jalur asam sikimat akan menghasilkan asam korismat yang merupakan satu dari beberapa jalur utama yang menghasilkan senyawa aromatik, termasuk asam amino aromatik. Satu cabang dari korismat akan memproduksi fenilalanin, yang mana oleh PAL akan diubah menjadi asam *trans* sinamat, yang dapat membentuk dua senyawa yang terlibat dalam pembentukan SA, asam ortho kumerik dan asam benzoat yang akan dihidroksilasi oleh BA2H menghasilkan SA. Jalur lain dari korismat menghasilkan isokorismat melalui aktivitas dari ICS, selanjutnya produk dimodifikasi oleh IPL untuk membentuk SA seperti yang terlihat pada gambar berikut (Davies, 2004).



Gambar 2. 11. Biosintesis Asam Salisilat (Davies, 2004)

Beberapa gen berperan penting dalam biosintesis SA dan menjadi penanda dalam sintesis SA. Faktor cekaman abiotik telah menjadi salah satu bukti modulasi enzim utama yang terlibat dalam biosintesis SA. Overproduksi SA melalui peningkatan aktivitas enzim terkait (ICS) pada tanaman membantu tanaman dalam meningkatkan proteksi terhadap cekaman lingkungan. ICS oleh Wildermuth *et al* (2001) dikatan ikut serta dalam biosintesis SA sebagai rangkaian dari pertahanan tanaman.

Pada tanaman dengan tingkat SA yang rendah, biosintesis SA tersebut diinduksi jika adanya cekaman biotik maupun abiotik. Misalnya, pada *Arabidopsis* dan tembakau, akumulasi SA dipicu oleh radiasi UV-C atau Ozon (Hedden dan Thomas, 2006). Pada tanaman dengan tingkat SA yang alami tinggi, seperti beras dan kentang, inokulasi patogen dapat tidak menginduksi biosintesis *de novo* SA (Silverman *et al.*, 1995).

2.4. *Housekeeping Gene*

Gen referensi merupakan gen reaksi kontrol internal yang memiliki sekuens berbeda dibandingkan dengan target. Untuk gen ini diperlukan beberapa kriteria penting (Chervoneva *et al.*, 2010). Hal yang paling penting dari gen referensi ini adalah bahwa ekspresi dari gen tersebut tidak berpengaruh terhadap faktor perlakuan yang diberikan. Disamping itu, gen ini harus memiliki variasi yang rendah pada ekspresinya diantara jaringan dan daerah fisiologi dari organisme. Sehingga gen yang dapat memenuhi kondisi tersebut merupakan gen metabolisme dasar, (atau yang disebut *housekeeping genes*) atau dalam definisi, ikut serta dalam proses yang esensial untuk kelangsungan sel dengan ekspresi stabil dan tidak diregulasi oleh tingkat yang konstan (Thellin *et al.*, 1999). Ekspresi gen referensi yang bervariasi secara signifikan dibawah kondisi percobaan yang berbeda memberikan kemungkinan bahwa kesalahan tersebut dihasilkan dari kesalahan normalisasi (Stephens *et al.*, 2011).

ef1 α merupakan salah satu contoh gen referensi yang menunjukkan sifat paling stabil. Hal tersebut ditunjukkan oleh Nicot *et al.* (2005) pada penelitiannya bahwa gen referensi actin dan tubulin mengalami peningkatan signifikan sedangkan ef1 α menunjukkan kestabilan paling tinggi pada uji stabilitas gen tersebut.

2.5. Polymerase Chain Reaction(PCR)

Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan salinan hanya dalam beberapa jam (Handoyo dan Ari, 2000). Keberhasilan amplifikasi dalam reaksi PCR ditentukan ada tidaknya primer oligonukleotida yang menempel dan menyatu dengan DNA template. Primer akan menempel pada DNA genom yang memiliki susunan basa nukleotida yang komplemen (Sunandar dan Imron, 2010). Di

samping ditentukan ada tidaknya situs penempelan primer, keberhasilan amplifikasi dipengaruhi pula oleh volume dan konsentrasi komponen dalam reaksi PCR, antara lain enzim DNA polymerase, template DNA, dNTP, buffer, serta kondisi reaksi PCR (Sambrook and Russell, 2001).

Proses PCR menggunakan menggunakan alat termosiklus. Sebuah mesin yang memiliki kemampuan untuk memanaskan sekaligus mendinginkan tabung reaksi dan mengatur temperatur untuk tiap tahapan reaksi. Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat (Yusuf, 2010). Proses tersebut antara lain :

1. Denaturasi

Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Proses ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda kembali) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktivitas enzim Taq polymerase. Aktivitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5 , 95 dan 97,5°C (Yusuf, 2010).

2. Annealing (penempelan primer)

Annealing merupakan proses penempelan primer pada DNA untai tunggal cetakan yang akan dilipatgandakan. Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan 72°C, namun suhu yang umum digunakan berada diantara 50 – 60°C (Yusuf, 2010). Disamping itu,

banyaknya kandungan GC dan konsentrasi primer itu sendiri berpengaruh terhadap penempelan primer pada DNA target.

3. *Extention (pemanjangan primer)*

Pada tahap ini Taq polymerase memulai aktivitasnya dengan memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa dibutuhkan waktu kurang lebih 1 menit untuk tahap perpanjangan primer. Umumnya, di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap akan diperpanjang hingga 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda (Yusuf, 2010).

PCR memiliki beberapa keunggulan, diantaranya dapat memperbanyak DNA pada bagian yang spesifik sesuai yang diharapkan (Sanderson *et al.*, 2003), memiliki sensitivitas tinggi, dapat digunakan untuk melakukan pengujian DNA (Loeffelholz dan Deng, 2006), dan mampu memberikan hasil dalam waktu singkat (Bell, 2002). Real-time PCR merupakan sebuah modifikasi terbaru dari metode PCR konvensional. Prinsip kerjanya hampir sama dengan PCR konvensional, namun real-time PCR dapat mengkuatifikasi dan memonitor secara langsung amplifikasi dari suatu DNA spesifik (Kubista *et al.*, 2006). Amplifikasi DNA dapat dipantau oleh instrumen real-time PCR oleh karena adanya suatu zat yang dinamakan fluorescent reporter. Fluorescent reporter merupakan zat yang berikatan dengan DNA target dan memancarkan sinyal fluoresensi yang menggambarkan jumlah produk yang dihasilkan. Fluorescent reporter terdiri atas fluorescent dye dan probe. Fluorescent dye pada dasarnya zat yang berfluoresensi ketika berikatan dengan DNA, sedangkan probe merupakan primer yang telah dilabeli dengan zat radioaktif dan bekerja seperti fluorescent

dye. Flourescent dye akan terus berikatan selama amplifikasi DNA, sehingga flourosensinya akan terus bertambah. Namun flourosensi akan berkurang ketika dye tidak mengimbangi jumlah DNA yang terus bertambah. Sinyal flourosensi ini ditampilkan sebagai kurva response yang menggambarkan jumlah DNA yang diperbanyak seiring jalanya siklus (Kubista *et al.*, 2006, Fraga *et al.*, 2008).

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada September 2016 hingga Januari 2017 di Laboratorium TDDC (*Tropical Disease Diagnostic Center*) Surabaya.

3.2 Metode Pelaksanaan

3.2.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel merupakan kegiatan penghalusan sebelum sampel diekstraksi untuk mendapatkan RNA. Sampel yang digunakan berupa hasil penelitian kultur jaringan tembakau Estiasih (2016) dengan tiga varietas berbeda yakni MKY, Marokot, dan Jepon Mawar. Pada 18-20 hari pertama (hingga muncul dua helai daun) media yang digunakan merupakan medium MS, kemudian setelah muncul 2 helai daun dipindahkan ke media dengan PEG 6000 30% (D30) untuk menginduksi kekeringan dan tanpa penambahan PEG sebagai kontrol setelah induksi pertumbuhan. Setelah satu minggu dengan perlakuan kekeringan, tanaman dipanen untuk dilakukan preparasi sampel ekstraksi RNA. Sampel dihaluskan dengan penambahan nitrogen cair sedikit demi sedikit agar proses lebih mudah dan sampel berubah menjadi bubuk halus.

3.2.2 Preparasi Primer

Masing-masing konsentrasi pasangan spesifik primer yang digunakan pada penelitian dioptimasi berdasarkan instruksi SYBR Green PCR *Master Mix* and *RT-PCR Protocol*, *Applied Biosystems* dengan data mengenai sekuens gen tersebut antara lain tampak pada tabel berikut.

Tabel 3. 1 Pasangan spesifik *primer forward* dan *primer reverse*

No	Gen	Nomer Akses	<i>Primer Forward</i> (5' → 3')	<i>Primer Reverse</i> (5' → 3')
1.	<i>NtACO</i>	AB012857	CTGGACTTGCT ATGTGAA	GTGGATAGTTG CTAACCTTA
2.	<i>NtGA3ox I</i>	EF471116	AGAGTCTATTC CAGTGAT	CCATATTGTCC AGTAGTC
3.	<i>NtICS</i>	AY740529	ATTGGAGGCTG TATGTTC	ATCTTCAGTCT GGAGTCT
4.	<i>NtAOS</i>	AB778304	CGGAGCGAACC CAGGTGAAAC	AGACCAAGAGT GACCAAAGGAT GAAG
5.	<i>NtEF-1a</i>	AF120093	TGAGATGCACC ACGAAGCTC	CCAACATTGTC ACCAGGAAGTG

3.2.3 Analisa Ekspresi Gen

a. Ekstraksi RNA Total

Ekstraksi RNA dilakukan menggunakan Total RNA Mini Kit (Plant) (Geneaid). Kit terdiri dari beberapa komponen yaitu RB Buffer, PRB Buffer, W1 Buffer, Wash Buffer, RNase-free water, Filter Column, RB Column dan 2 ml Collection Tube.

Ekstraksi RNA terdiri dari empat langkah, pertama adalah lisis (*Lysis*). Lima ratus μ l RB Buffer dan 5 μ l β -mercaptoethanol ditambahkan pada sampel yang telah digerus. Kemudian dicampur menggunakan vortex kemudian diinkubasi pada 60°C selama 5 menit. Sementara itu Kolom Filter ditempatkan dalam tabung koleksi 2 ml, kemudian campuran sampel ditransfer ke kolom, lalu dilakukan sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 1.000 rpm kemudian kolom filter dibuang. Filtrat dengan hati-hati ditransfer ke tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml baru.

Langkah kedua adalah pengikatan RNA (*RNA Binding*). Etanol absolut sebanyak 250 µl ditambahkan pada filtrat. Kolom RB ditempatkan dalam tabung koleksi 2 ml kemudian campuran ditransfer ke Kolom RB. Lalu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. Jika campuran tidak bisa mengalir melewati membran kolom RB setelah sentrifugasi, waktu sentrifugasi ditingkatkan sampai lolos sepenuhnya. Cairan dibuang lalu kolom RB ditempatkan kembali dalam tabung koleksi 2 ml.

Langkah ketiga adalah pencucian (*Washing*). Empat ratus µl Buffer W1 ditambahkan ke pusat kolom RB. Lalu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 30 detik. Cairan yang terdapat pada tabung penampung dibuang dan kolom RB ditempatkan kembali pada tabung penampung 2 ml. Lalu ditambahkan 600 µl Wash Buffer (yang telah ditambahkan etanol sebelumnya) ke pusat Kolom RB, disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 30 detik. Cairan yang terdapat pada tabung penampung dibuang kemudian kolom RB ditempatkan kembali pada tabung penampung 2 ml. Lalu 600 µl Wash Buffer (yang telah ditambahkan etanol sebelumnya) ditambahkan ke pusat Kolom RB. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. Cairan yang berada pada tabung penampung dibuang, kemudian kolom RB ditempatkan kembali pada tabung penampung. Kemudian kembali disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 3 menit untuk mengeringkan matriks kolom.

Langkah keempat adalah elusi RNA (*RNA Elution*). Kolom RB yang kering diletakkan dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml bersih. Kemudian ditambahkan 50 µl *RNase free water* menggunakan pipet mikro ke pusat matriks kolom, didiamkan selama minimal 2 menit untuk memastikan air bebas RNase benar-benar diserap, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit untuk mendapatkan RNA yang murni.

b. Kuantifikasi Konsentrasi RNA Total

Kuantifikasi konsentrasi RNA total dilakukan dengan menggunakan Nano Drop (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000).

Pertama, komputer yang berhubungan dengan Nano Drop dinyalakan dan software dijalankan. Kemudian, tempat sampel pada Nano Drop dilap menggunakan tissue bersih. RNase Free Water diukur terlebih dulu sebagai Blank. Kemudian sampel ditetaskan pada alat NanoDrop, maka secara otomatis konsentrasi RNA Total akan terdeteksi. RNase Free Water dan sampel yang ditetaskan pada alat NanoDrop untuk pengukuran adalah sebanyak 2 µl.

c. Analisa Kuantitatif PCR Real Time

Ekspresi gen yang telah ditentukan sebelumnya dianalisa dengan menggunakan Real-Time PCR kuantitatif (qRT-PCR). qRT-PCR dijalankan dengan menggunakan KAPA SYBR FAST Universal One-Step qRT-PCR Kit (Kapa Biosystem). Terdapat empat langkah analisa qRT-PCR menggunakan kit ini. Pertama, mempersiapkan campuran master PCR (yang mengandung MgCl₂). Harus dipastikan bahwa semua reagen di-*thawing* dan dikocok dengan benar. Campuran KAPA RT harus disimpan di atas es selama penggunaan dan reaksi-reaksi dilakukan di atas es. Adapun template RNA yang digunakan dalam penelitian ini memiliki konsentrasi 20 ng/ µl dari setiap sampel tiap perlakuan. Volume yang dibutuhkan dari masing-masing komponen dijelaskan dalam tabel berikut:

Tabel 3. 2. Komponen PCR

Komponen	Jumlah (µl)
<i>Nuclease free water</i>	<i>menyesuaikan</i>
2x KAPA SYBR FAST qPCR	5
Master Mix ² 10 µl Forward Primer	0. 2
Master Mix ² 10 µl Reverse Primer	0. 2
50X KAPA RT Mix	0.2

Template RNA	15 ng
Total	10

Langkah selanjutnya adalah mengatur reaksi individual. Volume yang sesuai dari semua komponen PCR ditransfer ke masing-masing tabung PCR. Selanjutnya, langkah ketiga, PCR dilakukan dengan protokol yang ditunjukkan pada Tabel 3.3. Adapun siklus PCR yang digunakan adalah sebanyak 39 siklus.

Tabel 3. 3. Kondisi PCR

Langkah	Temperatur	Durasi
<i>Reverse Transcription</i>	42°C	5 menit
Inaktivasi enzim	95°C	3 menit
Denaturasi	95°C	3 detik
<i>Annealing/ekstensi/Data acquisition</i>	61,3°C	20 detik

Langkah keempat adalah analisa hasil dengan penghitungan Ct yang didapatkan dari PCR *Real time*.

3.3 Analisa Hasil PCR *Real Time*

Data yang didapatkan dari qRT-PCR (berupa nilai *Threshold Cycle*) dihitung menggunakan metode Livak. Metode Livak merupakan kuantifikasi relatif berkaitan dengan sinyal PCR dari transkrip target dalam kelompok perlakuan dengan sampel yang lain seperti misalnya kontrol tidak diberi perlakuan. Metode ini adalah cara yang mudah untuk menganalisis perubahan relatif ekspresi gen dari eksperimen *real-time* PCR kuantitatif (Livak & Schmittgen, 2001). Untuk mendapatkan nilai tingkat ekspresi mRNA gen target. Langkah-langkah penghitungan adalah sebagai berikut:

- Normalisasi CT (gen target) terhadap CT (gen referensi)
 $\Delta CT(\text{kalibrator}) = CT(\text{target kalibrator}) - CT(\text{referensi kalibrator})$
 $\Delta CT(\text{tes}) = CT(\text{target tes}) - CT(\text{referensi tes})$

- b. Normalisasi ΔCT sampel terhadap ΔCT kalibrator
 $\Delta \Delta CT = \Delta CT (\text{tes}) - \Delta CT (\text{kalibrator})$
- c. Kalkulasi rasio ekspresi
 $\text{Rasio ekspresi} = 2^{-\Delta \Delta CT}$

3.4 Rancangan Penelitian dan Analisa Data

Rancangan penelitian ini menggunakan deskriptif kuantitatif dari representasi rasio ekspresi mRNA relatif $\pm SD$ berdasarkan data hasil qRT-PCR yang sebelumnya telah dihitung menggunakan metode Livak $2^{-\Delta \Delta CT}$.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekspresi gen merupakan proses dimana informasi dari gen digunakan dalam sintesis produk fungsional yang dapat berupa protein ataupun non-protein. Messenger RNA (mRNA) adalah molekul RNA yang berasal dari transkripsi DNA dan membawa informasi ke lokasi sintesis protein, ribosom. Di ribosom, mRNA kemudian akan ditranslasikan menjadi polimer asam amino; protein (Bolsover, 2014). Dengan demikian, level mRNA atau protein dapat merepresentasikan ekspresi gen yang terjadi berupa peningkatan (*up-regulated*) atau penurunan (*down-regulated*). Pada penelitian ini profil ekspresi gen dianalisis pada level transkriptomik menggunakan mRNA.

Perubahan tingkat ekspresi mRNA dalam penelitian ini dianalisa menggunakan *quantitative real time PCR*. mRNA akan ditranskripsi balik menjadi cDNA, kemudian cDNA akan digunakan sebagai cetakan dalam proses amplifikasi gen target menggunakan primer spesifik. Dalam proses amplifikasi tersebut, *amplicon* dari gen target dideteksi dengan menggunakan pewarna SYBR-Green. Pewarna akan mengikat untai minor DNA (Pochel *et al.*, 2003) dan memancarkan fluoresens 1000 kali lebih besar dibandingkan SYBR-Green bebas dalam larutan (Huang *et al.*, 1995). Oleh sebab itu, peningkatan jumlah DNA yang diamplifikasi menyebabkan jumlah pewarna yang terikat pada DNA juga bertambah, sehingga meningkatkan intensitas fluoresens dari SYBR-Green. Peningkatan jumlah DNA yang terdeteksi menggambarkan tingkat ekspresi gen (Pochel *et al.*, 2003).

Strategi kuantifikasi merupakan prinsip penentu pada analisis ekspresi gen menggunakan qRT-PCR yang secara umum terbagi menjadi dua strategi, kuantifikasi absolut dan relatif.

Kuantifikasi absolut berhubungan dengan sinyal PCR untuk selanjutnya dihitung menggunakan kurva kalibrasi, sedangkan kuantifikasi relatif menghitung perubahan relatif pada ekspresi mRNA dibandingkan dengan kontrol. Kuantifikasi relatif lebih mudah untuk dilakukan karena tidak dibutuhkan kurva kalibrasi. Hal tersebut tergantung pada level ekspresi dari gen target dibandingkan gen referensi (Pfaffl, 2004).

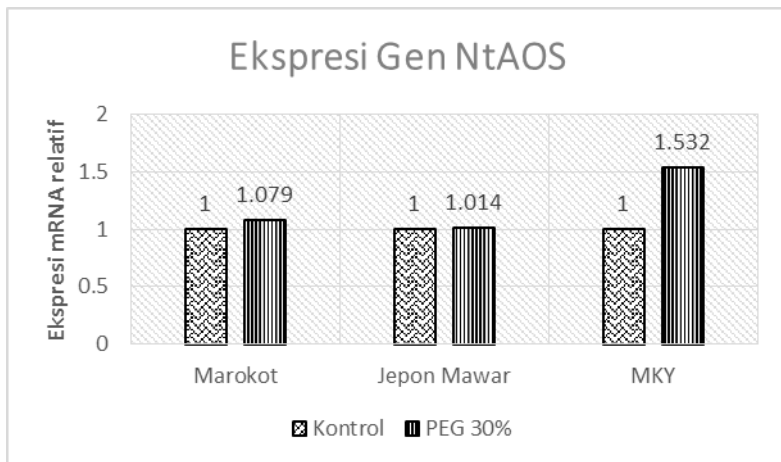
Gen referensi merupakan gen kontrol internal yang memiliki sekuens berbeda dibandingkan gen target (Chervoneva *et al.*, 2010) dengan ekspresi dari gen referensi tidak berpengaruh terhadap faktor perlakuan yang diberikan. *Ef1 α* adalah salah satu contoh gen referensi yang menunjukkan sifat paling stabil. Hal tersebut ditunjukkan oleh Nicot *et al.* (2005) pada penelitiannya bahwa actin dan tubulin mengalami peningkatan signifikan sedangkan *ef1 α* memiliki kestabilan paling tinggi pada uji stabilitasnya. Gen *EF-1 α* sendiri merupakan gen yang mengkode enzim EF-1 α yang berperan dalam sintesis protein, meningkatkan pengikatan GTP-dependen aminoasil tRNA pada ribosom selama fase elongasi translasi dan ikut serta dalam *proofreading* akurasi kodon-antikodon (Sturzenbaum & Kille, 2001).

Penggunaan PCR sebagai salah satu metode untuk mengetahui ekspresi gen dipengaruhi oleh berbagai hal, diantaranya adalah konsentrasi dan kemurnian RNA (cetakan). Adapun konsentrasi RNA total yang digunakan sebagai cetakan untuk proses PCR *Real Time* pada penelitian ini adalah 15 ng/ μ l dengan kemurnian RNA tampak pada lampiran. Kemurnian RNA didasarkan pada rasio gelombang 260 nm dan 280 nm. Asam nukleat mempunyai absorbansi maksimum pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan protein pada 280 nm. Nilai absorbansi protein yang tinggi dapat mempengaruhi akurasi data (Fleige, 2006) karena kemampuannya berasosiasi dengan RNA

sehingga pada kasus tertentu dapat menghambat aktivitas RNA (Sim, 2009). Rasio absorbansi pada kedua panjang gelombang tersebut digunakan untuk mengukur kemurnian (Teare *et al.*, 1997). Jika rasio 260/280 memberikan nilai dikisaran 1.8-2.0, maka hal tersebut merupakan salah satu indikator bahwa RNA tergolong baik untuk digunakan dalam penelitian (Fleige dan Pfaffl, 2006).

4.1.1 *NtACO*

NtACO adalah gen pada *Nicotiana tabacum* yang mengkode enzim *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase* (Chen *et al.*, 2003). Enzim ini berperan dalam mengkatalisis konversi ACC menjadi etilen (Jakubowicz *et al.*, 2010). Biosintesis etilen distimulasi pada saat tanaman mengalami cekaman, termasuk kekeringan (Morgan and Drew, 1997).

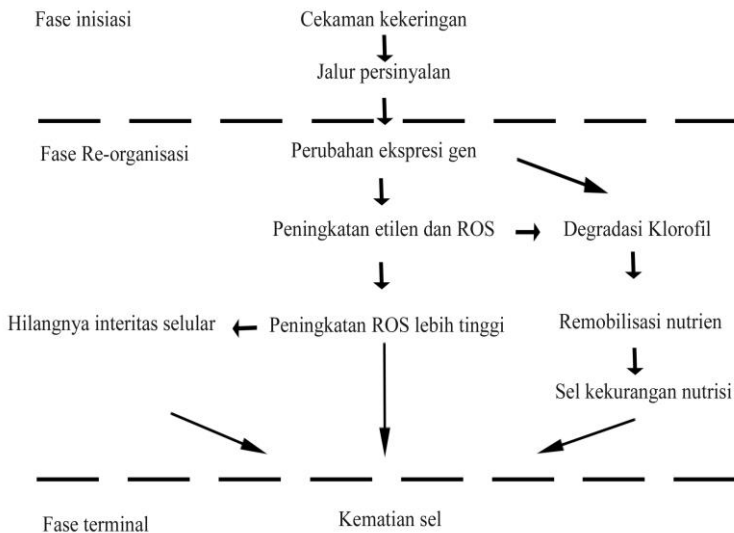


Gambar 4. 1 Ekspresi mRNA relatif gen *NtACO*

Tampak pada gambar 4.1 seiring peningkatan konsentrasi cekaman kekeringan yang diberikan, ekspresi dari gen *ACO* mengalami peningkatan di semua varietas uji (var. Marakot, Japon Mawar dan MKY) dibandingkan dengan kontrol, masing-

masing sebesar 1.079; 1.014; dan 1.532. Peningkatan produksi etilen juga ditunjukkan oleh Yang (2014) dalam penelitiannya melalui konsentrasi ACC yang meningkat ketika tanaman *Triticum aestivum* dicekam kekeringan, peningkatan yang terjadi merupakan salah satu mekanisme toleransi tanaman (Berumen, 1996) yang menunjukkan tanaman lebih toleran terhadap kekeringan (Du, 2014).

Kekeringan akan berdampak pada perubahan ekspresi gen-gen yang terlibat dalam regulasi pertahanan tanaman (Basra, 1993), termasuk peningkatan hormon etilen (Yang, 2014), degradasi klorofil (Munne-Bosch dan Alegre, 2004), dan diinduksinya penuaan pada tanaman (Munne-Bosch *et al.*, 2001) (Gambar 4.2).

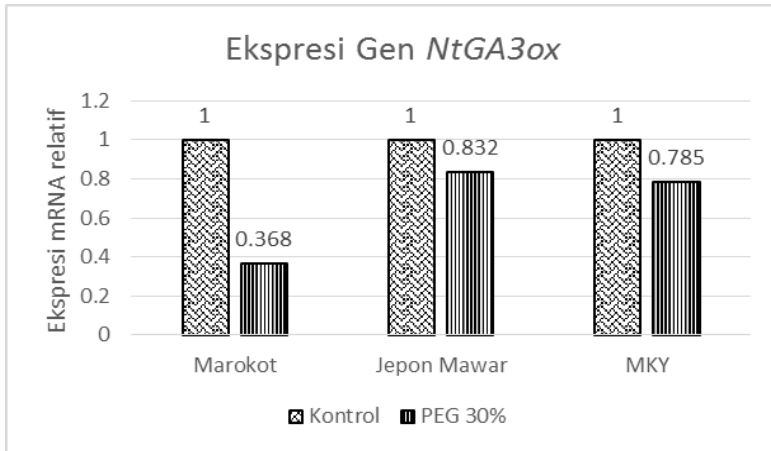


Gambar 4. 2 Model pengaruh kekeringan terhadap penuaan.
modifikasi dari Munné-Bosch dan Alegre (2004).

Penuaan berperan penting terhadap kelangsungan hidup tanaman pada kondisi tercekam kekeringan karena berkontribusi terhadap remobilisasi nutrisi (Munne-Bosch dan Alegre, 2004). Etilen turut serta sebagai regulator endogen penuaan pada tanaman (Gomez-Cadena *et al.*, 1996) melalui peningkatan ekspresinya yang mendorong degradasi klorofil untuk menginduksi kerja *chlorophyllase* pada membran kloroplas (Matile *et al.*, 1997). Peningkatan ekspresi etilen tersebut akan mendorong katabolisme klorofil yang mana selain berfungsi sebagai remobilisasi nutrisi selama proses penuaan, juga keberadaannya dapat menjadi sel fototoksin yang menghasilkan ROS dan membahayakan sel lain (Hortensteiner dan Krautler, 2011).

4.1.2 *NtGA3ox1*

NtGA3ox merupakan gen yang berperan dalam biosintesis giberelin pada *Nicotiana tabacum* (Gallego-Giraldo *et al.*, 2008). Gen tersebut mengkode enzim oksidase spesifik (GA 3-oksidase) untuk mengubah GA₂₀ menjadi GA₁ yang aktif (Davies, 2004) sebagai langkah terakhir dalam biosintesis giberelin (Gallego-Giraldo *et al.*, 2008). Tingkat ekspresi giberelin tampak pada gambar 4.3 yang menurun seiring peningkatan konsentrasi cekaman kekeringan yang diberikan pada masing-masing varietas uji, varietas Marokot mengalami penurunan sebesar 0.368 kali, varietas Jepon Mawar dan MKY masing-masing menurun 0.832 dan 0.785 kali dibandingkan dengan kontrol.



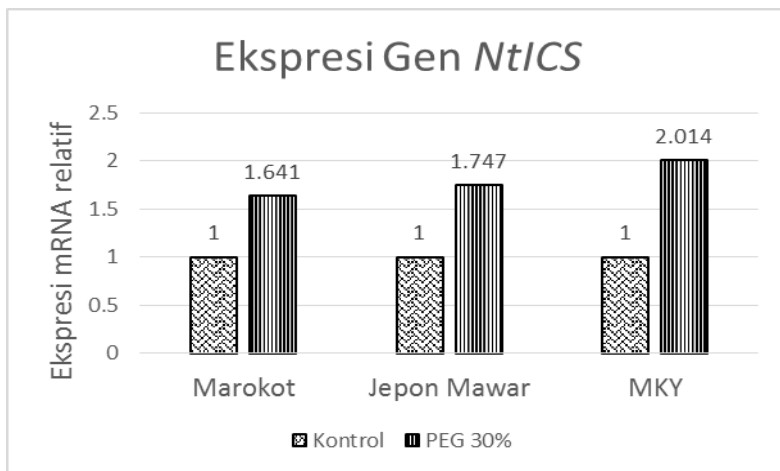
Gambar 4. 3 Ekspresi mRNA relatif gen *NtGA3ox*

Kekeringan menyebabkan *down regulation* pada ekspresi gen yang turut serta dalam biosintesis giberelin (Liu *et al.*, 2013; Zee vaart *et al.*, 1993). Ekspresi giberelin yang rendah tersebut akan menghambat pertumbuhan tinggi pada tanaman karena berperan sebagai hormon esensial pemanjangan dan pembelahan sel (Weller *et al.*, 1994). Pemanjangan sel oleh giberelin bekerja dengan melonggarkan dinding sel melalui cara yang berbeda dengan auksin yang dimediasi melalui asidifikasi (Taiz, 2002). Giberelin akan menginduksi *xyloglucan endotransglycosylase* (XET) untuk melakukan pemanjangan sel (Taiz, 2002). Peran giberelin terhadap pembelahan sel melalui kemampuannya mengaktifasi siklus pembelahan sel pertama pada transisi G1 menjadi fase S, mengarah pada peningkatan aktivitas mitosis (Taiz, 2002).. Ekspresi giberelin yang rendah akan menghambat kerja hormon tersebut dalam mempengaruhi pemanjangan dan pembelahan sel sehingga menyebabkan penurunan pertumbuhan tinggi tanaman selama tercekam kekeringan. Penurunan yang terjadi akibat reduksi pemanjangan selular dan pembelahan dibutuhkan untuk pertahanan tanaman dan akumulasi biomassa sehingga mencegah pertumbuhan agresif pada tanaman (Litvin,

2015). Hal tersebut dibuktikan oleh Zhang *et al* (2005) dalam penelitiannya bahwa tanaman mutan *s-dwarf* yang kerdil karena kurangnya sensitivitas terhadap giberelin memiliki efisiensi penggunaan air yang lebih baik. Tanaman yang lebih pendek dilaporkan lebih cocok terhadap lingkungan dimana cekaman kekeringan sering terjadi (Vettakkorumakankav *et al.*, 1999). Tanaman yang lebih pendek dapat meningkatkan produktivitas melalui pengurangan jalur transport nutrisi dari akar melalui batang ke daun dan pucuk.

4.1.3 *NtICS*

NtICS merupakan gen yang terlibat dalam biosintesis asam salisilat (Wildermuth *et al.*, 2001). Gen ini mengkode enzim *isochorismate synthase* (ICS) yang berperan dalam mengubah korismat menjadi isokorismat (Garcion *et al.*, 2008). Gen ICS pada tanaman telah diperiksa berada pada kloroplas, menunjukkan bahwa lokalisasi pada salah satu cabang dari jalur biosintesis asam salisilat ini berada pada plastida (Delaney, 2010).



Gambar 4. 4 Ekspresi mRNA relatif gen *NtICS*

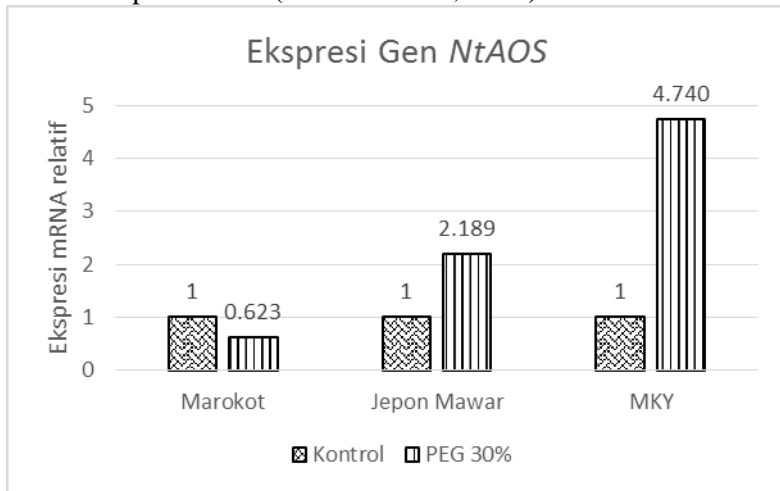
Tampak pada gambar 4.4 bahwa ekspresi dari gen *ICS* mengalami peningkatan pada masing-masing varietas uji, varietas Marokot sebesar 1.64 kali, varietas Jepon Mawar meningkat 1.74 kali, dan varietas MKY menunjukkan peningkatan tertinggi sebesar 2.01 kali dibandingkan kontrol. Pada penelitian lain juga menyebutkan tingkat endogen SA mengalami peningkatan ketika tercekam kekeringan hingga 5 fold pada *Phillyrea angustifolia* (Munne-Boschand Penuelas, 2003). Peningkatan yang terjadi karena akumulasi SA pada tanaman berperan dalam mekanisme proteksi selama cekaman kekeringan (Saruhan dan Saglam, 2012).

Efek umum dari cekaman kekeringan adalah kerusakan oksidatif akibat hilangnya keseimbangan antara produksi *reactive oxygen species* (ROS) dengan enzim antioksidan. Jika tidak dihilangkan secara efektif, tingkat ROS yang berlebihan dapat merusak makromolekul selular yang lebih luas. Mekanisme proteksi dari akumulasi asam salisilat adalah berupa kemampuannya dalam menginduksi aktivitas enzim antioksidan (Saruhan dan Saglam, 2012). ROS dapat mengalami penurunan sebagai akibat kenaikan SA yang dibuktikan oleh Saruhan dan Saglam (2012) melalui penelitiannya bahwa SA mendorong peningkatan enzim superoksida dismutase untuk menurunkan tingkat hidrogen peroksida sebagai salah satu jenis ROS.

4.1.4 *NtAOS*

NtAOS merupakan salah satu gen yang terlibat dalam biosintesis asam jasmonat pada tanaman tembakau (Laudert and Weiler, 1998). Gen ini mengkode enzim *allene oxide synthase* yang mengkatalis perubahan 3-hydroperoxylinolenate menjadi senyawa tak stabil allene epoksida yang kemudian disiklik untuk membentuk asam siklopentenon, prekursor asam jasmonat (Mueller, 1997). Respon adaptasi dari tanaman terhadap kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan sangat tergantung pada sinyal kimia yang diatur oleh hormon tanaman dengan sistem keseimbangan kompleks (Sreenivasulu *et al.*, 2012). Tingkat

endogen jasmonat dilaporkan meningkat ketika terpapar cekaman biotik maupun abiotik (Thomma *et al.*, 1998).



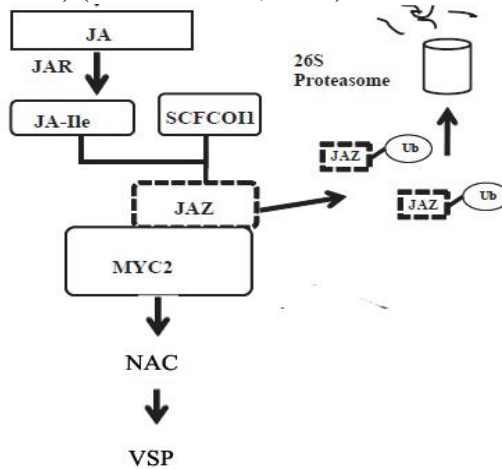
Gambar 4. 5 Ekspresi mRNA relatif gen NtAOS

Hasil pada gambar 4.6 mengkonfirmasi kecenderungan peningkatan asam jasmonat selama kekeringan. Varietas Marokot mengalami penurunan sebesar 0.623 kali, varietas Japon Mawar meningkat 2.188 kali, dan varietas MKY menunjukkan peningkatan tertinggi sebesar 4.74 kali dibandingkan kontrol. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Creelman dan Mullet (1995) bahwa terjadi peningkatan konsentrasi asam jasmonat tanaman kedelai ketika tercekam kekeringan.

Semakin tinggi asam jasmonat telah diimplikasikan mendorong toleransi terhadap cekaman melalui efek *downstreamnya* pada metabolisme antioksidan (Ai, 2008), antioksidan tersebut berperan dalam sistem perlawanan ROS sebagai sinyal ekspresi gen-gen pertahanan (Orozco, 1990) yang terus mengalami peningkatan dan berpotensi menyebabkan kematian sel (Alam *et al.*, 2014). Kemampuan jasmonat dalam mempengaruhi aktivasi gen-gen pengkode jalur biosintesis antioksidan dibuktikan oleh Sasaki-Sekimoto *et al* (2005) bahwa

asam jasmonat secara positif mempengaruhi akumulasi askorbat yang turut serta sebagai respon pertahanan terhadap stres oksidatif.

Eksresi beberapa gen sebagai respon JA dalam kondisi kekeringan selain sintesis antioksidan adalah VSP (*Vegetative Storage Protein*) (Staswick *et al.*, 1990).



Gambar 4. 6. Model keterkaitan asam jasmonat terhadap VSP, modifikasi dari Woldemariam *et al* (2011)

Keterkaitan asam jasmonat dalam menginduksi VSP tampak melalui akumulasi asam jasmonat yang menyebabkan degradasi JAZ oleh proteasome, membebaskan MYC2 yang kemudian memediasi transkripsi gen-gen perlawanan dan pertahanan termasuk kompleks NAC ((NAM/ATAF1, 2/CUC2) sebagai faktor transkripsi VSP (Woldemariam *et al.*, 2011), sehingga peningkatan asam jasmonat akan diiringi oleh peningkatan VSP. VSP berperan penting sebagai penyimpanan sementara N yang tidak digunakan pada tanaman (Staswick *et al.*, 1990). Hal tersebut karena nitrogen berperan dalam pertumbuhan tanaman, sedangkan disisi lain kekeringan menurunkan kecepatan pertumbuhan (Kramer, 1983), kelebihan sintesis nitrogen yang

terjadi dapat menjadi racun (Staswick *et al.*, 1990), sehingga nitrogen kemudian diubah menjadi VSP oleh tanaman. Hal tersebut sesuai dengan (Lee *et al.*, 2014) bahwa terjadi peningkatan VSP tanaman *Trifolium repens* pada kondisi kekeringan.

Berdasarkan hasil yang didapatkan, tampak terjadinya perbedaan ekspresi di setiap varietas uji tembakau (Var. Marakot, Japon Mawar, dan MKY) pada gen yang berbeda, hal tersebut sesuai dengan Estiasih (2016) bahwa varietas sebagai faktor genotip dapat mempengaruhi ekspresi gen.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah bahwa perbedaan varietas akan mempengaruhi tingkat ekspresi masing-masing gen, dengan kelipatan sebagai berikut:

1. Gen *NtACO* dan *NtICS* menunjukkan ekspresi yang lebih tinggi ketika dicekam kekeringan dengan PEG 6000 30% pada varietas uji Marakot, Japon Mawar, dan MKY. *NtACO* masing-masing 1.08, 1.01, dan 1.53 kali dan *NtICS* masing-masing 1.64, 1.74, dan 2.01 kali dibandingkan dengan kontrol.
2. Gen *NtAOS* menunjukkan penurunan 0.62 kali pada var. Marakot dan meningkat sebesar 2.18 dan 4.74 kali pada var. Japon Mawar dan MKY.
3. Gen *NtGA3ox* mengalami penurunan ekspresi ketika tercekam kekeringan dengan PEG 6000 30% pada varietas uji Marakot, Japon Mawar, dan MKY. Penurunan tersebut masing-masing 0.36 kali, 0.83 kali, dan 0.78 kali dibandingkan dengan kontrol.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diajukan saran untuk penelitian selanjutnya sebagai berikut:

1. Melakukan analisa ekspresi gen-gen *NtACO*, *NtGA3ox*, *NtICS*, dan *NtAOS* dengan cekaman kekeringan namun dilandaskan pula lamanya pemaparan kekeringan.
2. Perlu dilakukan analisa ekspresi gen-gen terkait biosintesis hormon lain seperti auksin, brassinosteroid, dan strigolaktin agar diperoleh pemahaman yang komprehensif mengenai respon dan keterkaitan hormon

pada ketiga varietas tembakau terhadap cekaman kekeringan.

3. Analisa secara morfologi dan anatomi juga perlu dilakukan untuk dapat dijadikan sebagai acuan berikut perbandingan terhadap hasil penelitian ekspresi gen-gen yang berkaitan.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal, S. 2008. **Techniques in Molecular Biology**. International Book Distributing Co., Lucknow.
- Ai, L., Li, Z. H., Xie, Z. X., Tian, X. L., Eneji, A. E., and Duan, L. S. 2008. Coronatine Alleviates Polyethylene Glycol-induced Water Stress in Two Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. **J. Agron. Crop. Sci.** 194: 360–368.
- Alam, Mahabub., Nahar, Kamrun., Hasanuzzaman, Mirza., Fujita, Masayu. 2014. Exogenous Jasmonic Acid Modulates the Physiology, Antioxidant Defence and Glyoxalase Systems in Imparting Drought Stress Tolerance in Different *Brassica* species. **Plant Biotechnol Rep.** Vol 8: 279-293.
- Alves, M. S. and Fietto, L. G. 2012. **Issues in Life Sciences: Botany and Plant Biology Research**. Atlanta: Scholarly Editions.
- Amor, M.B., M. Guis, A. Latache, M. Bouzayen, J.C. Pech, J.P. Roustan. 1998. Expression of an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene stimulates shoot regeneration in *Cucumis melo*. **Plant Cell Rep.** 17:586-589.
- Arc, Erwann., Sechet, Julien., Corbineau, Francoise., Rajjou, Loic., Marion-Poll, Annie. 2013. ABA Crosstalk with Ethylene and Nitric Oxide in Seed Dormancy and Germination. **Frointiers in Plant Science**. Vol 4.
- Arshad M, Frankenberger WT. 2002. **Ethylene**. Dordrecht, NL: Kluwer Academic Press.
- Aulia, R.F.K. 2005. Respon Perkecambahan dan Anatomi Akar Beberapa Varietas Kedelai Berdaya Hasil Tinggi terhadap Cekaman Kekeringan dengan Menggunakan PEG. **Skripsi**. FMIPA Brawijaya.
- Bandurska, H., and Cieslak, M. 2013. The Interactive Effect of Water Deficit and UV-B Radiation on Salicylic Acid

Accumulation in Barley roots and leaves. **Environ. Exp. Bot.** 94: 9–18.

Barkht, J. A. and Shafi, M. 2012. Antimicrobial activity of *Nicotiana tabacum* using different solvents extracts. **Pak J Bot**; 44:459-463

Basra, Amarjit. 1993. **Stress-Induced Gene Expression in Plants**. India: Harwood Academic Publisher.

Berumen, Salvador., Lownds, Norman. 1996. Ethylene Production as A Drought Stress Response in *Cassia Corymbosa*. *HortScience*. Vol 31(4).

Bell, C. and A. Kyriakides. 2002. **Salmonella : A Practical Approach to The Organism and Its Control In Foods**. Blackwell Science, Ltd., Oxford

Bolsover, Stephen. 2014. *Cell Biology: A Short Course*. USA: Cram 101.

Buchanan, Bob., Gruissem, Wilhelm., Jones, Russell. 2015. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. USA: Wiley Blackwell.

Budianto, Sholahuddin., S, Biharsjah., Rumawas. 1984. Pengaruh Tekanan Kekeringan terhadap Pertumbuhan dan Produksi Beberapa Varietas Kedelai pada Grumusol Lombok Tengah. **Buletin Agronomi**, XIV: 17-30.

Cahyono, Bambang. 1998. **TEMBAKAU, Budi daya dan Analisis Tani**. Yogyakarta : Kanisius

Cameron, K. D., Teece, M. A. and Smart, L. B. 2006. Increased Accumulation of Cuticular Wax and Expression of Lipid Transfer Protein in Response to Periodic Drying Events in Leaves of Tree Tobacco. **Plant Physiology** 140:176–183.

Campbell, Neil., Reece, Campbell, Jane., Urry, Lisa., Cain, Michael., Wasserman, Steven., Minorsky, Peter., Jackson, Robert. **Biologi**. Edisi Kedelapan Jilid II. Jakarta: Erlangga.

Chen, N., Goodwin, P.H., Hsiang, T. 2003. The Role of Ethylene during The Infection of *Nicotiana tabacum* by *Colletotrichum destructivum*. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 54, No. 392: 2449±2456

Borsani O., Valpuesta V., and Botella M. A. 2001. Evidence For A Role of Salicylic Acid in The Oxidative Damage Generated by NaCl And Osmotic Stress in *Arabidopsis* Seedlings. **Plant Physiol.** 126, 1024Ð1030.

Chervoneva I, Li Y, Schulz S, Croker S, Wilson C, Waldman SA, Hyslop T. 2010. Selection of Optimal Reference Genes for Normalization in Quantitative RT-PCR. **BMC Bioinforma.** 11:253. doi: 10.1186/1471-2105-11-253.

Creelman, R. A., and Mullet, J. E. 1995. Jasmonic Acid Distribution and Action in Plants: Regulation during Development and Response to Biotic and Abiotic Stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 92, 4114–4119.

Creelman, Robert., Mullet, John. 1997. Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:355–81.

Davies, Peter. 2004. **Plant Hormones**. London: Kluwer Academic Publishers.

Delaney, Patrick. 2010. **Chapter Salicylic Acid**. DOI: 10.1007/978-1-4020-2686-7_29.

Dewi, Noviana C., Nurhidayati, Tutik., Purwani, Kristanti I. 2015. Pengaruh Penambahan PEG (*Polyethylene glycol*) Terhadap Profil Protein Tembakau (*Nicotiana tabacum* L. var *Prancak 95*) pada Media *In Vitro*. **POMITS**.

Disbun. 2007. **Buku Pedoman Standarisasi Mutu Tembakau**. Jawa Barat: Disbun.

Djumali., Mulyaningsih, Sri. 2013. Pengaruh Cekaman Air Terhadap Karakter Fisiologis Tembakau Temanggung dan Kaitannya dengan Hasil dan Kadar Nikotin Rajangan Kering. **Buletin Tanaman Tembakau, Serat & Minyak Industri**. Vol5(2): 78–9.

Du, H., Wu, N., Cui, F., You, L., Li, X., Xiong, L. 2014. A homolog of ETHYLENE OVERPRODUCER, *OsETOL1*, Differentially Modulates Drought and Submergence Tolerance in Rice. **Plant J.** 78, 834–849.

Enjang, S. 2011. **Musim Kemarau Produksi Tembakau Cirebon Menurun**. Antaranews.com [19 September 2016].

Estiasih, Erma. 2016. Profil Ekspresi Gen Responsif terhadap Cekaman Kekeringan dari Beberapa Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Tipe Burley. **Skripsi**. Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S. 2008. Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. **Agron. Sustain. Dev.** 29: 185–212

Fleige, Simone., Pfaffl, Michael. 2006. RNA Integrity and The Effect on The Real-Time qRT-PCR Performance. **Molecular Aspects of Medicine**. Volume 27: 126–139.

Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real-time PCR. 2008. **In: Gallagher SR, Wiley EA (eds.) Current Protocols Essential Laboratory Techniques**. Wily. p1-32.

Gallego-Giraldo, Lina., Ubeda-Tomas, Susana., Gisbert, Carmina., Garcia-Martinez, Jose., Moritz, Thomas., Lopez-dia, Isabel. 2008. Gibberellin Homeostasis in Tobacco is Regulated by Gibberellin Metabolism Genes with Different Gibberellin Sensitivity. **Plant Cell Physiol.** Vol 49(5): 679–690.

Garcion, C., Lohmann, A., Lamodièrre, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P. 2008. Characterization and Biological Function

of The ISOCHORISMATE SYNTHASE2 Gene of *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 147: 1279–1287.

Ge L, Liu JZ, Wong WS, Hsiao WLW, Chong K, Xu K, Yang SF, Kung SD, Li N. 2000. Identification of a novel multiple environmental factor-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene, NT-ACS2, from tobacco. **Plant, Cell and Environment** 23, 1169±1182.

Geiss, O. 2007. **Tobacco, Cigarettes and Cigarette Smoke**. Italia: European Commission Directorate-General Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection.

Ghanta, Srijani., Bhattacharyya, Dipto., Sinha, Ragini., Banerjee, Anindita., Chattopadhyay, Sharmila. 2011. *Nicotiana tabacum* overexpressing γ -ECS exhibits biotic stress tolerance likely through NPR1-dependent salicylic acid mediated pathway. **Planta**. Vol 233:895–910.

Ghebremariam, K. M., Liang, Y., Li, C., Li, Y. and Qin, L. 2013. Screening of Tomato Inbred-Lines for Drought Tolerance at Germination and Seedling Stage. **Journal of Agricultural Science** 5: 1916-9760.

Golla-Schindler, U., 2004. **STEM-Unit measurements in a scanning electron microscope**. In: Proceedings of the European Microscopy Congress in Antwerpen.

Gomez-Cadena, A., F.R. Tadeo, and M.E. PrimmoMillo. 1996. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. **Plant Physiol.** 112:401– 408.

Grosser, T., Smyth, E.M., dan Fitzgerald, G.A.. 2011. **Anti-inflammatory, Antipyretic, and Analgesic Agent; Pharmacology of Gout**. In: **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Edisi Ke-12. New york: McGraw-Hill. Halaman 986-987.

Hamayun, M., Khan, S., Shinwari, Z., Khan, L., Ahmad, N., Lee, In-Jung. 2010. Effect of Polyethylene Glycol Induced Drought Stress On Physio-Hormonal Attributes Of Soybean. **Pak. J. Bot.**, 42(2): 977-986.

Hamilton, A.J., M. Bouzayen, D. Grierson. 1991. Identification of tomato gene for the ethyleneforming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:7434-7437.

Handoyo, D. dan Ari, R. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). **Unitas**, 9(1), 17-29.

Harris D., Tripathi R.S., Joshi A. 2002. On-farm seed priming to improve crop establishment and yield in dry direct-seeded rice, in: Pandey S., Mortimer M., Wade L., Tuong T.P., Lopes K., Hardy B. (Eds.), Direct seeding: Research Strategies and Opportunities, **International Research Institute**, Manila, Philippines, pp. 231–240.

He, Yuehui., Fukushima, Hirotada., Hildebrand, David., Gan, Susheng. 2002. Evidence Supporting a Role of Jasmonic Acid in Arabidopsis Leaf Senescence. **Plant Physiology**. Vol 128: 876-884.

Hedden, P. 1999. Recent advances in gibberellin biosynthesis. **J Exp Bot**. 50: 553–563.

Hedden, Peter., Thomas, Stephen. 2006. **Plant Hormone Signaling**. India: Blackwell Publishing

Herrmann, K.M., and Weaver, L.M. (1999). The shikimate pathway .**Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 50,473–503.doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.473

Hortensteiner, Stefan., Krautler, Bernhard. 2011. Chlorophyll Breakdown in Higher Plants. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1807 : 977–988.

Huang SK, Yi M, Palmer E, Marsh DG. 1995. A dominant T cell receptor beta-chainin response to a short ragweed allergen, Amb a 5. **J Immunol.** Volume 154: 6157–62.

Huang, Yuan., Wang, Xi., Ge, Song., Rao, Guang-Yuan. 2015. Divergence and Adaptive Evolution of The Gibberellin Oxidase Genes in Plants. **BMC Evolutionary Biology.** Vol 15: 207.

Jakubowicz, Malgorzata., Galganska, Hanna., Nowak, Witold., Sadowski, Jan. 2010. Exogenously Induced Expression of Ethylene Biosynthesis, Ethylene Perception, Phospholipase D, and Rboh-Oxidase Genes In Broccoli Seedlings. **Journal of Experimental Botany.** Vol. 61, No. 12: 3475–3491.

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 100–105.

Jia, H., Wang, C., Wang, F., Liu, S., Li, G., Guo, X. 2015. GhWRKY68 Reduces Resistance to Salt and Drought in Transgenic *Nicotiana benthamiana*. **Journal of PLoS ONE.** Vol 10(3): e0120646.

Kang H. M. and Saltveit M. E. 2002. Chilling Tolerance Of Maize, Cucumber And Rice Seedling Leaves And Roots Are Differentially Affected by Salicylic Acid. **Physiol. Plant.** 115, 571D576.

Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. 2002. Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. **J. Biol. Chem.** Vol 277: 45188–45194.

Kawakami J., Iwama K., Jitsuyama Y. 2006. Soil water stress and the growth and yield of potato plants grown from microtubers and conventional seed tubers, **Field Crop. Res.** 95, 89–96.

Kende, H. 1989. Enzymes of ethylene biosynthesis. **Plant Physiol.** 91:1-4.

Khan, M.I., Fatma, Mehar., Per, Tasir., Anjum, Naser., Khan, Nafees. 2015. Salicylic acid-induced Abiotic Stress Tolerance and Underlying Mechanisms in Plants. **Frontiers in Plant Science.** doi: 10.3380.

Kishore, K. 2014. Monograph Of Tobacco (Nicotiana Tabacum), Review Article. **Indian Journal Of Drugs** 2: 2348-1684.

Klee, H.J., M. B. Hayford, K. A. Kretzmer, G. F. Barry, G. M. Kishore. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of bacterial enzyme in transgenic tomato. **Plant Cell** 3:1187-1193.

Kohlerschmidt, D.J., K.A. Musser, and N.B. Dumas. 'Identification of Aerobic GramNegative Bacteria'. Dalam Goldman, E. and L.H. Green (ed.). 2009. **Practical Handbook of Microbiology, Second Edition.** CRC Press, Boca Raton.

Kramer, P.J. 1983. **Water Relations of Plants.** Orlando: Academic Press.

Krizek, D. T. 1985. Methods of inducing water stress in plants. **HortScience**, 20: 1028 - 1038.

Ksir , C. and Benson, D.M. 1983. Enhanced behavioral response to nicotine in an animal model of Alzheimer's disease. **Psychopharmacology.** 81:272-273.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K. 2006. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine.**; 27:95-125.

Lai, Yan., Dang, Feng, Feng., Lin, Jing., Yu, Lu., Lin, Jinhui., Lei, Yufen., Chen, Chengcong., Liu, Zhiqin., Qiu, Ailian., Mou, Shaoliang., Guan, Deyi., Wu, Yang., He, Shuilin. 2014. Overexpression of a pepper CaERF5 gene in tobacco plants enhances resistance to Ralstonia solanacearum infection. **Functional Plant Biology.** Vol 41, 758–767.

Laudert D, Weiler EW. 1998. Allene Oxide Synthase: A Major Control Point in Arabidopsis Thaliana Octadecanoid Signalling. **Plant J.** 15: 675–684.

Lee, Bok-Rye., Lee, Dong-Gi., Avice, Jean-Christophe., Kim, Tae-Hwan. 2014. Characterization of Vegetative Storage Protein (VSP) and Low Molecular Proteins Induced by Water Deficit in Stolon of White Clover. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** Volume 443: 229-223.

Levit, J. 1972. **Responses of Plant to Environmental Stress, Edisi II.** New York: Academic Press.

Lin, Zhefeng., Zhong, Silin., Grierson, Don. 2009. Darwin Review: Recent Advances in Ethylene Research. **Journal of Experimental Botany.** Vol 60 (12): 3311 – 3336.

Litvin, Alexander. Interaction of Drought Stress and Gibberellin Metabolism on Stem Elongation in Tomato. **Thesis.** The University of Georgia.

Liu, T., S. Zhu, L. Fu, Y. Yu, Q. Tang, and S. Tang. 2013. Morphological and Physiological Changes of Ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) in Response to Drought Stress and GA3 Treatment. *Rus. J. Plant Physiol.* 60:749-55.

Loeffelholz, M. and H. Deng. ‘PCR and Its Variations’. Dalam Tang, Y.W. and C.W. Stratton (ed.). 2006. **Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology.** Springer Science+Business Media LLC., New York

Matile, P., Schellenberg, M., Vicentini, F. 1997. Localization of Chlorophyllase in The Envelope of Barley Gerontoplasts. **Plant Physiology and Biochemistry.** Volume 34: 55-9.

Mazahery-Laghab H., Nouri F., Abianeh H.Z. (2003) Effects of the reduction of drought stress using supplementary irrigation for

sunflower (*Helianthus annuus*) in dry farming conditions, Pajouheshva- Sazandegi. **Agron. Hort.** 59, 81–86.

Morgan PW, Jordan WR, Davenport TL, Durham JJ. 1977. Abscission responses to moisture stress, auxin transport inhibitors and ethephon. **Plant Physiol.** 59: 710-712

Mueller, MJ. 1997. Enzymes Involved in Jasmonic Acid Biosynthesis. **Physiol Plant.** 100: 653–663.

Munne-Bosch S. and Penuelas J. 2003. Photo- And Antioxidative Protection, And A Role for Salicylic Acid During Drought And Recovery In Field-Grown *Phillyrea Angustifolia* Plants. **Planta** 217, 758–766.

Munne-bosch, S., Jubany-Mari, T., Slegre, L. 2001. Drought-Induced Senescence is Characterized by A Loss of Antioxidant Defences in Chloroplast. **Plant Cell and Environment.** Vol 24: 1319-1327.

Munne-Bosch, Sergi., Alegre, Leonor. 2004. Die and Let Live: Leaf Senescence Contributes to Plant Survival Under Drought Stress. **Functional Plant Biology.** 2004, 31, 203–216.

Munne-Bosch,S., Penuelas, J. 2003. Photo and Antioxidative Protection, and A Role for Salicylic Acid during Drought and Recovery in Field-grown *Phillyrea angustifolia* Plants. **Planta.** 217: 758–766.

Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D. 2005. Housekeeping Gene Selection for Real-Time RT-PCR Normalization In Potato During Biotic and Abiotic Stress. **J Exp Bot.** Vol 56 (421):2907–2914. doi: 10.1093/jxb/eri285.

Noggle, G.R., G.J Fritz. 1986. **Introductory Plant Physiology Second Edition.** New Delhi: Prentice Hall.

Oeller P.W., L-M. Wong, L.P. Taylor, D. A. Pike, A. Theologies. 1991. Reversible inhibition of tomato fruits senescence by antisense RNA. **Science**. Vol 254:437-439.

Passaribu, D., Sunarlim. 1988. Cekaman Kekeringan pada Kedelai. **Seminar Hasil Penelitian Tanaman Pangan**. Bogor: Balittan.

Pfaffl, Michael. 2004. **Quantification Strategies in Real-time PCR**. USA: International University Line (IUL).

Picton, S., S.L. Barton, M. Bouzayen, A.J. Hamilton, D. Grierson. 1993. Altered ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene –forming enzyme transgene. **Plant J**.3:469-481.

Pochel, Frederique., Toomer, Carmel., Bransfield, Kieran., Leong, Fong., Douglas, Susan., Field, Sarah., Bell, Sandra., Combaret, Valerie., Puisieux, Alain., Mighell, Alan., Robinson, Philip., Inglehearn, Chris., Isaacs, John., Markham, Alex. 2003. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan Assay for A Relative Quantification of Gene Rearrangements, Gene Amplifications and Micro Gene Deletions. **Biomed Central**. Vol 3: 18.

PT. Sadhana. 2015. **Buku Kunci Identifikasi Tanaman Tembakau**. Purwosari: PT. Sadhana.

responses from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Biosci. Rep.** (28) :7–14

Rochman, Fatkhir., Suwarso., Murdiyati. 2006. Potensi Hasil dan Mutu Varietas Introduksi Tembakau Burley. **Zuriat**. Vol. 17, No. 2.

Rozov, S.M., Zagorskaya, A., Shcherbakov, D.N., Belavin, P.A., Deineko, E.V., Shumnyi, V.K. 2012. **Doklady Biochemistry and Biophysics**. Vol 444: 140–143.

Salisbury, F.B. and C.W. Ross. 1995. **Fisiologi Tumbuhan. Jilid I**. Bandung : Penerbit ITB, Bandung. 241 hal.

Samarah N.H. (2005) Effects of drought stress on growth and yield of barley, **Agron. Sustain. Dev.** 25, 145–149.

Sambrook J. and Russell D. W. 2001. **Molecular Cloning: A laboratory manual 3rd ed.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Sanderson, K. and D. Nichols. ‘Genetic Techniques : PCR, NASBA, Hybridisation and Microarrays’. Dalam McMeekin, T.A. (ed.). 2003. **Detecting Pathogens in Food**. Woodhead Publishing Limited, Cambridge and CRC Press LLC., Boca Raton.

Saruhan, Neslihan., Saglam, Aykut. 2012. Salicylic Acid Pretreatment Induces Drought Tolerance And Delays Leaf Rolling by Inducing Antioxidant Systems in Maize Genotypes. **Acta Physiol Plant**. Vol 34: 97-106.

Sasaki-Sekimoto, Yuko., Taki, Nozomi., Obayashi, Takeshi., Aono, Mitsuko., Matsumoto, Fuminori., Sakurai, Nozomu., Suzuki, Hideyuki., Hirai, Masami., Noji, Masaaki., Saito, Kazuki., Masuda, Tatsuru., Takamiya, Ken-ichiro., Shibata, Daisuke., Ohta, Hiroyuki. 2005. Coordinated Activation of Metabolic Pathways for Antioxidants and Defence Compounds by Jasmonates and Their Roles in Stress Tolerance in Arabidopsis. **The Plant Journal**. Volume 44: 653–668.

Sasscer, C. Jr., and D. Bowman. 1988. **Burley Official Variety Test and The Regional Minimum Standard Program**. Burley Tobacco Information. The North Carolina Agric.

Sato Y, Takehisa H, Kamatsuki K, Minami H, Namiki N, Ikawa H, et al. 2013. RiceXPro version 3.0: expanding the informatics resource for rice transcriptome. **Nucleic Acids Res.**;41(Database issue):D1206–13.

Sela-Buurlage, B. M., Ponstein, S.A., Bres-Vloemans, A.S., Melchers, S.L., van den Elzen, J. M. P. and Cornelissen J.C. B. 1993. Only Specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Chitinases and 8-1,3-Clucanases Exhibit antifungal activity. **Plant Physiol**; 101: 857-863.

Shah J. 2003. The salicylic Acid Loop in Plant Defense. **Curr. Opin. Plant Biol.** 6, 365-371.

Shehab, G. G., Ahmed, O. K. and El-Beltagi, H. S. 2010. Effects Of Various Chemical Agents For Alleviation Of Drought Stress In Rice Plants (*Oryza Sativa* L.). **Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj** 38: 139-148.

Shi Q., Bao Z., Zhu Z., Ying Q., and Qian Q. 2006. Effects Of Different Treatments Of Salicylic Acid On Heat Tolerance, Chlorophyll Fluorescence, And Antioxidant Enzyme Activity In Seedlings of *Cucumis Sativa* L. **Plant Growth Regul.** 48, 127-135.

Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Métraux, J.P. & Raskin, I. 1995. Salicylic acid in rice – biosynthesis, conjugation, and possible role. **Plant Physiol.**, 108, 633–639.

Sim, Soyeong., Weinberg, David., Fuchs, Gabriele., Choi, Keum., Chung, Jina., Wolin, Sandra. 2009. The Subcellular Distribution of an RNA Quality Control Protein, the Ro Autoantigen, Is Regulated by Noncoding Y RNA Binding. **Mol Biol Cell.** Volume 20(5): 1555–1564.

Soeparno, Haryono., Pasandaran, Effendi., Syarwani, Muhrizal., Dariah, Ai., Pasaribu, Sahat., Saad, Nono. 2013. **Politik Pembangunan Pertanian Menghadapi Perubahan Iklim.** Jakarta: IAARD Press.

Somerville C., Briscoe J. 2001. Genetic engineering and water, **Science** 292, 2217.

Sreenivasulu, N., Harshavardhan, V.T., Govind, G., Seiler, C., Kohli, A. 2012. Contrapuntal Role Of ABA: Does It Mediate Stress Tolerance Or Plant Growth Retardation Underlong-Term Drought Stress?. **J Gene.** 506: 265–273.doi: 10.1016/j.gene.2012.06.076.

Staswick, Paul., Huang, Jing., Rhee, Yoon. 1990. Nitrogen and Methyl Jasmonate Induction of Soybean Vegetative Storage Protein Genes. **Plant Physiol.** 96: 130-136.

Sucahyono, Nurhaidi. 2011. **Petani Tembakau Jateng Terancam Gagal Panen Karena Faktor Iklim.** Diakses dari <http://www.voaindonesia.com/a/petani-tembakau-jateng-terancam-gagal-panen-karena-faktor-iklim/1723461.html> pada [1 Oktober 2016]

Sun, Tai-ping. 2008. Gibberellin Metabolism, Perception and Signaling Pathways in Arabidopsis. **American Society of Plant Biologists.** doi: 10.1199

Sunandar, D. dan Imron. 2010. Optimalisasi Template DNA Genom Udang Galah, *Macrobrachium rosenbergii* dalam Proses PCR-RAPD. **Loka Riset dan Teknologi Budidaya Perikanan Air Tawar.**

Susilowati, Eka Y. 2006. Identifikasi Nikotin dari Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Kering dan Uji Efektivitas Ekstrak Daun Tembakau sebagai Insektisida Penggerek Batang Padi (*Scirpophaga innotata*). **Skripsi.** Universitas Negeri Semarang.

Sturzenbaum SR., & Kille P. 2001. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** 130:281–289.

Taiz L. dan Zeiger, 2003. **Plant Physiology** . The Benyaming/Cumming Publishing Company. Inc New York.

Thomma, B. P., Eggermont, K., Penninckx, I. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P., et al. 1998. Separate

Jasmonate Dependent and Salicylate-Dependent Defense-Response Pathways In Arabidopsis are Essential for Resistance to Distinct Microbial Pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 95: 15107–15111.

Tjitrosoepomo, G.. 2000. **Morfologi Tumbuhan**. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Trebitsh, Tov., Goldschmidt, Eliezer., Riov. 1993. Ethylene induces de novo synthesis of Chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in citrus fruit peel. **Proc Natl Acad sci**. Vol 90: 9441-9445.

Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K. 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. **Nature**. 455, 195–200.

Vettakkorumakankav, N.N., D. Falk, P. Saxena, and R.A. Fletcher. 1999. A Crucial Role for Gibberellins in Stress Protection of Plants. **Plant Cell Physiol**. 40 :542-548.

Vicente, Mariana R., Plasencia, Javier. 2011. Review Paper: Salicylic Acid Beyond Defence: Its role in Plant Growth and Development. **Journal of Experimental Botany**. Vol 62 (10): 3321-3338.

Walia H, Wilson C, Condamine P, Liu X, Ismail AM, Close TJ. 2007. Large-scale expression profiling and physiological characterization of jasmonic acid-mediated adaptation of barley to salinity stress. **Plant Cell Environ**. Vol 30(4):410–21.

Wasternack, C., Hause, B. 2013. Jasmonates: Biosynthesis, Perception, Signal Transduction, and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. **Annals of Botany**. Vol 111: 1021-1058.

Weller, J.L., J.J. Ross, J.B. Reid. 1994. Gibberellins and Phytochrome Regulation of Stem Elongation in Pea. **Planta**. 192:489-496.

Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M. 2001. Isochorismate Synthase is Required to Synthesize Salicylic Acid for Plant Defence. **Nature** 414: 562–565.

Wilso, A.L., Langley, L.K., Monley, J., Bauer, T., Rottunda, S., McFalls, E. et al 1995. Nicotine patches in Alzheimer's disease: pilot study on learning, memory, and safety. **Pharmacol Biochem Behav**; 51:509-514.

Woldemariam, Melkamu G., Ian T. Baldwin & Ivan Galis. 2011. Transcriptional Regulation of Plant Inducible Defenses Against Herbivores: A Mini-review. **Journal of Plant Interactions**. 6:2-3, 113-119.

Yamaguchi, S., Sun, T.-p., Kawaide, H., and Kamiya, Y. 1998. The GA2 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes ent-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis. **Plant Physiol**. 116: 1271-1278.

Yang, W., Yin, Y. Jiang, W., Peng, D., Yang, Y., Cui, Y. Wang, Z. 2014. Severe Water Deficit-Induced Ethylene Production Decreases Photosynthesis and Photochemical Efficiency in Flag Leaves of Wheat. **Photosynthetica** 52 (X): XXX-XXX.

Yeats, T. H. and Rose, J. K. C. 2008. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). **Protein Science** 17: 191-198.

Yuliana. 2010. Pengaruh Invigorasi Menggunakan PEG 6000 terhadap Viabilitas Benih Tembakau (*Nicotiana tabacum*). **Skripsi**. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

Yusuf, Z.K. 2010. Polymerase Chain Reaction. **Jurnal Saintek**. Vol 5 : No 6.

Zarei, S., Ehsanpour, A. A. and Abbaspour, J. 2012. The role of over expression of P5CS gene on proline, catalase, ascorbate peroxidase activity and lipid peroxidation of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plant under in vitro drought stress. **Journal of Cell and Molecular Research**. 1:43-49.

Zeevaart, J.A., D.A. Gage, and M. Talon. 1993. Gibberellin A1 is Required for Stem Elongation in Spinach. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 90:7401-7405.

Zeid I.M., Shedeed Z.A. (2006) Response of alfalfa to putrescine treatment under drought stress, **Biol. Plant.** 50, 635–640.

Zhang, Xiuhai., Chen, Xuqing., Wu, Xiaodong., Huang, Conglin., Cao, Mingqing. 2005. A Dwarf Wheat Mutant is Associated with Increased Drought Resistance and Altered Response to Gravity. **African journal of Biotechnology**. Vol 4(10): 1054-1057.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

LAMPIRAN
Lampiran 1. Spesifikasi Primer

Tabel 6.1 Spesifikasi primer

Hormon	Gen	Nomor aksesori	Amplikon	Cross dimer	posisi primer	panjang	Tm	GC	Hairpin	Self Dimer
				kcal/mol		bp	C	%	kcal/mol	kcal/mol
Etilen	<i>NtACO</i>	AB012857	105	-3.8	452	20	55.91	50	-1.8	-1.8
					557	20	56	55	0	0
Giberelin	<i>NtGA3ox</i>	EF471116	135	-0.1	192	18	55.1	38.9	0	-0.7
					327	18	55,1	44.4	0	-0.6
Asam salisilat	<i>NtICS1</i>	AY740529	111	-1.2	582	18	58.1	44.4	0	0
					693	18	57.9	44.4	0	-1.2
Asam jasmonat	<i>NtAOS</i>	AB778304	73	-1.5	696	21	61	61.9	0	-1.5
					769	26	60.85	46.15	0	0

Lampiran 2. Sekuens Gen

>AB012857.1 *Nicotiana tabacum* mRNA for ACC oxidase |
mRNA | 1236 bp

```

1 Cggatttttattttattgtattacatttttaacgcacttaaaaaaca
1      10      20      30      40
1 Gcctaaaaataaaaataacataaatgtaaaaattgcgtgaatttttgt

46 cacatacttaccaagaagatatggagaacttcccaattatcaac
46      50      60      70      80
46 gtgtatgaatgggttctttctatacctcttgaagggttaatagttg

91 ttggaaaagctcaatggttctgagagagctgacaccatggaaatg
91      100     110     120     130
91 aaccttttcgagttaccaagactctctcgactgtggtacctttac

136 attaaggatgcttgtgagaactggggcttctttgagttggtgaac
136      140     150     160     170
136 taattcctacgaacactcttgaccccgaaagaaactcaaccacttg

181 catgggattccacatgaagtaatggatacagtgagaaaaatgaca
181      190     200     210     220
181 gtaccctaaggtgtacttcattacctatgtcacctcttttactgt

226 aagggaacattacaagaagtgcattggaacagagatttaaagaattg
226      230     240     250     260
226 ttccctgtaatgttcttcacgtaccttgtctctaaatttcttaac

271 gtggccagcaaaggtcttgaagctgtgcaagctgaggttactgat
271      280     290     300     310
271 caccggtcgtttccagaacttcgacacgttcgactccaatgacta

316 ttggattgggaaaagcacttttctttttacgccatcttctgtttct
316      320     330     340     350
316 aacctaaccctttcgtgaaagaaaaatgcggtagaaggacaaaaga

361 aacatttgtgaagtacctgatctcgatgatcaatacaggaagta
361      370     380     390     400
361 ttgtaaacacttcatggactagagctactagttatgtcccttcat

406 atgagagattttctcaaagattagaaaaattggcagaggagttta
406      410     420     430     440
406 tactctctaaaacgagtttctaatctttttaaccgtctcctcaat

```

>>>NtACO forward>>> 451 to 468

```
451 ctggacttgctatgtgaaaatcttggccttgaaaaggctacctg
451          460          470          480          490
451 gacctgaacgatacacacttttagaaccggaactttttccgatggac
```

<<<NtACO reverse<<< 537 to 556

```
496 aaaaaaatcttttatgggacacaaggtcccaattttgagctaag
496          500          510          520          530
496 ttttttagaaaaataccctgtgttccagggttaaacctcgattc
```

```
541 gttagcaactatccaccatgtccccaaccagatttgataaagggt
541          550          560          570          580
541 caatcgttgataggtggtacaggggttggtctaaactatttccca
```

```
586 ctgcgcgcccacacagatgctggtggcataatccttctcttccaa
586          590          600          610          620
586 gacgcgcggtgtgtctacgaccacgtattaggaagagaagggt
```

```
631 gatgacaaagtaagcggccttcaactcctcaaagacggccaatgg
631          640          650          660          670
631 ctactgttttcattcgccggaagttgaggagttttctgccggttac
```

```
676 atcgatgttcctcccatgcgccactctattgtggttaaccttggc
676          680          690          700          710
676 tagctacaaggagggtacgcggtgagataacaccaattggaaccg
```

```
721 gaccaacttgaggtgatcaccaatgggaaatacaagagtgtgatg
721          730          740          750          760
721 ctgggttgaaactccactagtggttaccctttatgttctcacactac
```

```
766 cacagagtgattacacaaacagacgggactcggatgtcattagct
766          770          780          790          800
766 gtgtctcactaatgtgtttgtctgccttgagcctacagtaatcga
```

```
811 tcattttataatccaggaagtgatgcagtaatatttccagcacca
811          820          830          840          850
811 agtaaaatattaggtccttcactacgtcattataaaggctcggtg
```

```
856 acttttagttgagaaagaggcagaggaaagtaaagcaatttatcca
856          860          870          880          890
856 tgaaatcaactctttctccgtctcctttcatttcgttaaataggt
```

```
901 aagtttgtgtttgatgataatatgaagttatatgctggactcaag
901          910          920          930          940
901 ttcaaacacaaactactattatacttcaatatacgacctgagttc
```

```
946 tttcaagccaaagagccaaggtttgaagccatgatcaaggccatg
```



```

946      950      960      970      980
946 aaagttcgggtttctcggttccaaacttcggtactagttccggtac

991 gaaactgtgaaaagtgatccagttgcaactgcttaaattccaatt
991      1000      1010      1020      1030
991 ctttgacacttttctactaggtcaacgttgacgaatttaagggttaa

1036 cgagaggaaggatggggtttgaaaagaaaaggattcatttttagaa
1036      1040      1050      1060      1070
1036 gctctccttcctaccccaaacttttcttttcctaagtaaaatcct

1081 gtttttacaaattaaacctagctactatatatacattatttgctc
1081      1090      1100      1110      1120
1081 caaaaatgtttaatttgatcgatgatatatatgtaataaacgag

1126 ttgtattgtgtgtggtggaatcaagctattcccaaattattgtga
1126      1130      1140      1150      1160
1126 aaacataacacacaccaccttagttcgataagggtttataacact

1171 tctgctgcatatgtagtaaagattgtatctcaataaacttcctt
1171      1180      1190      1200      1210
1171 agacgcagtatacatcatttctaacatagagtttatttgaaggaa

1216 ctcattgaattttccaaaccg
1216      1220      1230
1216 gagtaacttaaggtttggc

```

>EF471116.1 *Nicotiana tabacum* gibberellin 3-oxidase 2
(GA3ox2) mRNA | 1345 bp

```

1 gggacaaaacaaatcccactcctcttcttataactaactttttcca
1      10      20      30      40
1 ccctgttttgtttagggtgaggagaagaatattgattgaaaagggt

46 ctacattaccttttgattatttccactatgccttcaagaatctccg
46      50      60      70      80
46 gatgtaatggaaaactaataaagtgatacgggaagttcttagaggc

91 acgatgttcatcaaaaacaacttgacttgtaacacaataaaaagaat
91      100      110      120      130
91 tgctacaagtagtttttgttgaactgaacatgtgttattttcttta

136 taccggaatcccacatgcatggcgatcatcattagatcatgattacc
136      140      150      160      170

```

136 atgggcttagggtacgtaccgctagtagtaatctagtactaatgg

>>>NtGA3ox forward>>> 197 to 214

181 aatgcaatgactcattagagtctattccagtgatcgatctaaacg

181 190 200 210 220

181 ttacgttactgagtaatctcagataaggtcactagctagatttgc

226 acgagaaaattcgcaatagaaaatattggccatgcatgcaaaacat

226 230 240 250 260

226 tgctctttaagcggttatcttttataaccggtagctacgttttga

<<<NtGA3ox reverse<<< 310 to 327

271 ggggtgcattccaaatcataaaccataatatatctcagagactac

271 280 290 300 310

271 ccccacgtaaggtttagtagtttgggtattatatagagtctctgatg

316 tggacaatatggaggaagctggaaaacgactttttcccttcgga

316 320 330 340 350

316 acctgttatacctccttcgaccttttggctgaaaaaaggggaaggct

361 tgcagaaaaaattgaaggctgctcgttctgcagatgggtattgctg

361 370 380 390 400

361 acgtcgtttttaacttcgacgagcaagacgtctaccataacgac

406 gttatggcgtggctcgcatatcgtcttttttctcaaagctcatgt

406 410 420 430 440

406 caataccgcaccgagcgtatagcagaaaaaagagtttcgcagtaca

451 ggtctgaaggtttcacaattgttggttcccatttggaccacgccc

451 460 470 480 490

451 ccgacttccaaagtgttaacaaccaaggggtaaactgggtgcggg

496 gccaaactttggccacatgattacaagaattctgtgacgtaatcg

496 500 510 520 530

496 cggttgaaaccggtgtactaatgttctttaagacactgcattagc

541 aagaatacgaaggagatggaaaaactagccggaagactgatgt

541 550 560 570 580

541 ttcttatgcttttctctacctttttgatcggccttctgactaca

586 ggctgatgcttgggtcacttgaataagtaaggacgatatgaaat

586 590 600 610 620

586 ccgactacgaaccagtgaaaccttattcattcctgctataacttta

631 gggcttgcttgcggcccaagaggagaatgctcggccctacaactaa

631 640 650 660 670

631 cccgaacaacgccgggttctcctcttacgagccgggatgttgatt
 676 attcttaccggcatgtccggatccggatcgggccatgggtcttg
 676 680 690 700 710
 676 taagaatgggccgtacaggcctaggcctagcccgggtaccagaaac
 721 ctgcacatacggattctaccatattaaccatccttcacccaaaac
 721 730 740 750 760
 721 gacgtgtatgcctaagatggtataattggtagggaagtggttttgt
 766 acacaagtgggtttacaagtgtttaagaaggaaatggttgggtca
 766 770 780 790 800
 766 tgtgtttcaccaaatgttcacaaatttcttctttaccaaccagtc
 811 cggttcctccgctttcgggtgcattagttatcaacgtaggtgact
 811 820 830 840 850
 811 gccaaaggaggcgaaagcccacgtaataatagttgcatccactga
 856 tgttacacatactgtcaaacgggttataccgagtggttctacatc
 856 860 870 880 890
 856 acaatgtgtatgacagtttgccaatatgggctcacaagatgtga
 901 gggcggtagtgaaccgaaccgcacccggtttatcgggtggcctatt
 901 910 920 930 940
 901 cccgccatcacttggttggttggtgcaaatagccaccggataa
 946 tatatggaccaccgtcgggggtgaaaatttcaccgcttttctaaat
 946 950 960 970 980
 946 atatacctggtggcagccccacttttaaagtggcgaaagattta
 991 tggtagatcaagggcaccctccattatataggtcagtgacgtgga
 991 1000 1010 1020 1030
 991 accatctagttcccgtgggaggtaatatatccagtcactgcacct
 1036 gtgagtatttagggactaaggcaaacgatttcgacaaagcacttt
 1036 1040 1050 1060 1070
 1036 cactcataaatccctgattccgtttcgtaaagctgtttcgtgaaa
 1081 cgtcttttcagcttttgcgctcctcgtattggatttgccaatccca
 1081 1090 1100 1110 1120
 1081 gcagaaaaagtcgaaacgcgaggagcataacctaaacggttaggggt
 1126 aagatcgtaatacgcgtccaagttggctaatttgactagtagttac
 1126 1130 1140 1150 1160
 1126 ttctagcattatcgcaggttcaaccgattaaactgatcatcaatg
 1171 cttttaatttttctttttggtttctgaaaatatatatctacttgt

```

1171          1180          1190          1200          1210
1171 gaaaattaaaaagaaaaaccaaagacttttatatatagatgaaca

1216 gttccttttctactctttggaattttttgttgatatttcgagaga
1216          1220          1230          1240          1250
1216 caaggaaaagtgagaaaccttaaaaaaacaactataaagctctct

1261 gaatgaaaaaggtgtagatcgatcattttatcaatctttctacct
1261          1270          1280          1290          1300
1261 cttactttttccacatctagctagtaaaatagttagaaagatgga

1306 gtcctttctaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
1306          1310          1320          1330          1340
1306 caggaaagatcctttttttttttttttttttttttttttt

```

>AY740529.1 *Nicotiana tabacum* isochorismate synthase
protein (ICS1) Mrna| 907 bp

```

 1 caggttgagtttgatgagcttgaaggaggttcagttattgctgca
 1          10          20          30          40
 1 gtccaactcaaactactcgaacttccttcaagtcaataacgacgt

46 acagtcgcatgggataatgctgtctcttgacgtaccagagggca
46          50          60          70          80
46 tgtcagcgtaccctattacgacagagaacgtgcatgggtctcccgt

91 atagaagcacttcagaccacaatatggcagggttctcctcggttctt
91          100          110          120          130
91 tatcttcgtgaagctctggtgttataccgtccaaaggaggcaagaa

136 atgaggggtgcggaaaaaaatatctcgttcgcataatactcgcaagt
136          140          150          160          170
136 tactcccacgcctttttttatagagcaagcgtatatgagcgttca

181 actcatgtcccggttaaagcatcttacgaccaagctgttaagcgt
181          190          200          210          220
181 tgagtacagggccatttcgtagaatgctggttcgacaattcgca

226 gctttgcaaataataagaagaacaacccgatgcttatcaagggtg
226          230          240          250          260
226 cgaaacggtttattattcttctttgttgggctacgaatagttccac

271 gtacttgctcgtagcaccagagttgtgacagctgcggacattgat
271          280          290          300          310

```

```

271 catgaacgagcatcgtgggtctcaacactgtcgacgcctgtaacta
316 cctttaacatggttatcttgcttaaagggtgaaggagaaaaatgca
316      320      330      340      350
316 ggaaattgtaccaatagaacgaatttccaacttcctcttttacgt

361 tatcagttctgtttgcaacctccccagtcagcggcattcattgga
361      370      380      390      400
361 atagtcaagacaaacgttggaggggtcagtcgccgtaagtaacct

406 aacactccagagcagctatttcatcgggactgcctcagcatttgt
406      410      420      430      440
406 ttgtgaggtctctgctcgataaaagtagccctgacggagtcgtaaaaca

451 agcgaggcttttagctggaacacgggctaggggtggatcagagctt
451      460      470      480      490
451 tcgctccgaaatcgaccttgtgccgatccccacctagtctcgaa

496 ctggatcttaagataggacaggatttactatccagtgctaaggac
496      500      510      520      530
496 gacctagaattctatcctgtcctaaatgataggtcacgattcctg

```

>>>NtICS forward>>> 582 to 599

```

541 cataatgagtttctatagtacgggagtgcataagaagaaaattg
541      550      560      570      580
541 gtattactcaaacgatatcatgccctcacgtattcttcttttaac

586 gaggctgtatgttccagcgttttaattgaaccaaagaaagcaata
586      590      600      610      620
586 ctccgacatacaaggctcgcaaaattaacttggttcttttcgttat

631 agaaaatttccaagagttcaacatctttatgctcaattgaggggg
631      640      650      660      670
631 tcttttaaaaggttctcaagttgtagaatacagagttaactcccc

```

<<<NtICS reverse<<< 676 to 693

```

676 agactccagactgaagatgatgagtttaagatcttgtcgtccatt
676      680      690      700      710
676 tctgaggtctgacttctactactcaaattctagaacagcaggtaa

721 caccctactccagcagtttgtgggtatcctacagaagatgcacgg
721      730      740      750      760
721 gtgggatgaggtcgtcaaacacccataggatgtcttctactgtgcc

766 gcttttatttcagaaaccgaaatgtttgaccgaggaatgtatgct
766      770      780      790      800

```

```

766 cgaaaataaagtcctttggctttacaaactggctccttacatacga
811 ggtcctgttgggtggtttggaggggaagagagtgaatttgcgtgtt
811      820      830      840      850
811 ccaggacaaccaaccaaactccccttctctcacttaaagcagaca

856 ggaataaaggtcagctttggttgacaagggtcttgggtgcattaatt
856      860      870      880      890
856 ccttattccagtcgaaaccaactgttcccagaaccacgtaattaa

901 tatgcgg
901
901 atacgcc

```

>AB778304.1 *Nicotiana tabacum* AOS mRNA for allene
oxyde synthase| 1569 bp

```

1 atggcagtagcaacacagcaacattatcttcgtcttcttca
1      10      20      30      40
1 taccgcatcgttgcgttgctggttgtaatagaagcagaagaagt

46 ctccctttccattctcttcaccaacagtttccatcaaaatacttc
46      50      60      70      80
46 gaaggaaaaggtaaagagaagtggttgtaaaggtagttttatgaag

91 attgttcgtcccattacactctctttatcagaaaaaataccaaca
91      100      110      120      130
91 taacaagcagggtaatgtgagagaaatagtcttttttatggttgt

136 agaacaactgtaacacaaatcatctgagctcacaaaattaccaatc
136      140      150      160      170
136 tcttggtgacattgtgttagtagactcgagtgttttaatggttag

181 cgtaaaattcccggcgattatgggtcttccctttaattgggtccatgg
181      190      200      210      220
181 gcatttttaagggcgctaataaccagaaggaaattaaccaggtacc

226 aaagatagacaagattatttttataatcaaggtaaagaagaattc
226      230      240      250      260
226 tttctatctgttctaataaaaatatttagttccatttcttcttaag

271 ttcagatcaagagttcaaaaatacaaatctactgtattttaaacc
271      280      290      300      310
271 aagtctagttctcaagtttttatgtttagatgacataaattttgg

316 aatatgccacctggaaatttcatttcttccaacccaacgttgtc
316      320      330      340      350

```

```

316 ttatacgggtggacctttaagtaaagaaggttgggttgcacag
361 gttttgctcgacggcaagagttttccgatccttttcgacgtttct
361      370      380      390      400
361 caaaacgagctgccgttctcaaaaggctaggaagctgcaaaga

406 aaagtcgaaaagaaggatctcttcaccggaactttcatgccgtcg
406      410      420      430      440
406 tttcagctttttcttccctagagaagtggccttgaaagtacggcagc

451 actgaactcactggcgggttacggtgttctttcttatcttgatcct
451      460      470      480      490
451 tgacttgagtgaccgccaatggcacaagaaagaatagaactagga

496 tctgaacctaacctagaaaaattaaaaagcttctcttttttctt
496      500      510      520      530
496 agacttgagattggtactttttaatttttctgaagagaaaaagaa

541 ctttcttctcgtcgtgattatataatacccgaattccatgaaagc
541      550      560      570      580
541 gaaagaagagcagcactaatatattatggggttaaggtactttcg

586 tataccgagctgtttgaaaccctagaaaaggaaatggagaaaaat
586      590      600      610      620
586 atatggctcgacaaactttgggatcctttcctttacctcttttta

631 ggtaaagctgatttaaactcggctaatagatcaagctgcttttaatt
631      640      650      660      670
631 ccatttcgactaaatttgagccgattactagtttcgacgaaaatta
    >>>NtAOS forward>>> 696 to 716

676 ttcttggtgggatcactgtacggagcgaaccaggtgaaactcag
676      680      690      700      710
676 aagaaccgacctagtgcacatgcctcgcttgggtccactttgagtc

721 ctcggaactgatggtccacattgatcggaaaatgggtgttgttt
721      730      740      750      760
721 gagccttgactaccagggtgtaactagccttttaccacaacaaa
    <<<NtAOS reverse<<< 769 to 794

766 cagcttcacccctttggtcactcttggctctccgaaggttctagat
766      770      780      790      800
766 gtcgaagtaggaaccagtgagaaccagaaggcttccaagatcta

811 gacttttctcctccataatttccggttaccgccagctctggtgaag
811      820      830      840      850
811 ctgaaagaggaggtattaaaggccaatggcggctcgagaccacttc

```

```

856 aaagattaccagagactctacgatttcttctatgagagctccact
856      860      870      880      890
856 tttctaattgggtctctgagatgctaaagaagatactctcgaggtga

901 gctgtgctaaacgaagctgaaacttttgggtatttcgcgagaagaa
901      910      920      930      940
901 cgacacgatttgcttcgactttgaaaaccataaaagcgctcttctt

946 gcttgtcataatcttctcttcgctacgtgtttcaattcctttggc
946      950      960      970      980
946 cgaacagtattagaagagaagcgatgcacaaagttaaggaaccg

991 gggatgaagattttcttccccaatatgctgaaatggatagctaaa
991      1000      1010      1020      1030
991 ccctacttctaaaagaagggttatacgactttacctatcgattt

1036 gcagggctagagcttcatacacgggttagcgaacgagatccgatcc
1036      1040      1050      1060      1070
1036 cgtcccgatctcgaagtatgtgccaatcgcttgctctaggctagg

1081 gccgtgaaatccgccggcggaagatcacgatgttggcgatggag
1081      1090      1100      1110      1120
1081 cggcacttttaggcggcgcccttctagtgtctacaaccgctacctc

1126 aaaatgccgtgatgaaatcggttgatatacgaggctttacgaatt
1126      1130      1140      1150      1160
1126 ttttacggcgactacttttagccaacatatgctccgaaatgcttaa

1171 gatccaccagttgcttctcaatacgaagagccaaacgcgacctt
1171      1180      1190      1200      1210
1171 ctaggtggtcaacgaagagttatgccttctcggtttgcgctggaa

1216 atgatcgaatcacacgatgccgtttttgaggtgaagaaaggggaa
1216      1220      1230      1240      1250
1216 tactagcttagtgtgctacggcaaaaaactccacttctttccctt

1261 ttgttatttcgggtaccaaccatttgcgacgaaggatccgaagatt
1261      1270      1280      1290      1300
1261 aacaataagcccattggttgtaaacgctgcttcctaggcttctaa

1306 tttgaccgacccgatgagttcgtaaccgatcggttcgtaggtgaa
1306      1310      1320      1330      1340
1306 aaactggctgggctactcaagcatgggctagccaagcatccactt

1351 gaaggggaaaagtgtgtgaacatgtattatggtctaacggaccg
1351      1360      1370      1380      1390

```



```

1351 cttccctttttcaacaactttgtacataataccagattgcctggc

1396 gaaacggagagtccgacggtggagaataaacagtgtgccggaaag
1396      1400      1410      1420      1430
1396 ctttgctctcaggctgccacctcttatttgtcacacggcctttc

1441 gattttgtggtgctggtttcgagattgtttgtaacggaggttttt
1441      1450      1460      1470      1480
1441 ctaaaacaccacgaccaagctctaacaaacattgcctccaaaaa

1486 ctccgttatgacacgttggatgtcgacgtcggtagctcgccggtta
1486      1490      1500      1510      1520
1486 gaggcaatactgtgcaacctacagctgcagccatgcagcggaat

1531 ggagctaagattactataacctctttgaagagagcttag
1531      1540      1550      1560
1531 cctcgattctaataatgatattggagaaacttctctcgaatc

```

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

Lampiran 3. Pengenceran Primer

Pengenceran primer menggunakan rumus

$$M_1.V_1 = M_2.V_2$$

Keterangan:

M= Konsentrasi (ng/μl)

V= Volume (μl)

dengan nilai M_2 yang diinginkan sebesar 15 ng/μl yang diambil dari konsentrasi cetakan (M_1) yang telah dikuantifikasi menggunakan nanodrop, volume yang diinginkan (V_1) disesuaikan dengan volume (V_2) 10 μl. Berdasarkan acuan tersebut, didapatkan volume yang diperlukan guna pengenceran primer ditunjukkan pada tabel berikut.

Varietas	Perlakuan	konsentrasi 1	Konsentrasi 2	Volume 2	Volume 1
	PEG	ng/μl	ng/μl	μl	μl
<i>JM</i>	0	210.2	15	10	0.714
		75.7	15	10	1.982
	30	92.4	15	10	1.623
		46.8	15	10	3.205
<i>MKY</i>	0	54.5	15	10	2.752
		81	15	10	1.852
	30	38.8	15	10	3.866
		57.2	15	10	2.622
<i>Marokot</i>	0	125.4	15	10	1.196
		102.7	15	10	1.461
	30	173	15	10	0.867
		87.1	15	10	1.722

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

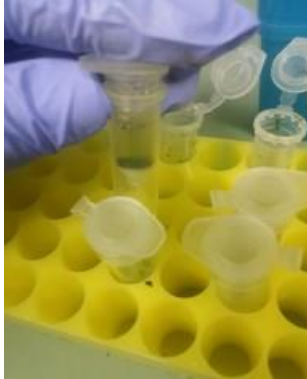
Lampiran 4. Hasil Optimasi
Hasil optimasi

Name	Number Rep	Ct	Set. Point
AM	17	N/A	60
AM	18	N/A	59
AM	19	24.09	57.2
AM	20	22.72	54.5
AM	21	22.13	50.7
AM	22	N/A	48
AM	23	21.96	46.1
AM	24	21.34	45
AO10	81	N/A	60
AO10	82	N/A	59
AO10	83	N/A	57.2
AO10	84	N/A	54.5
AO10	85	N/A	50.7
AO10	86	N/A	48
AO10	87	N/A	46.1
AO10	88	N/A	45
ACO	9	N/A	60
ACO	10	N/A	59
ACO	11	26.28	57.2
ACO	12	24.22	54.5
ACO	13	N/A	50.7
ACO	14	22.26	48
ACO	15	22.73	46.1
ACO	16	21.3	45
GA	41	N/A	60
GA	42	N/A	59
GA	43	N/A	57.2
GA	44	N/A	54.5
GA	45	N/A	50.7

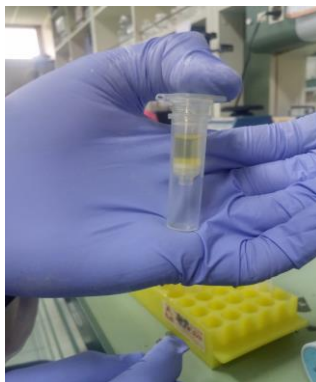
GA	46	N/A	48
GA	47	N/A	46.1
GA	48	N/A	45
IC	49	N/A	60
IC	50	N/A	59
IC	51	28.54	57.2
IC	52	26.24	54.5
IC	53	26.67	50.7
IC	54	24.47	48
IC	55	22.99	46.1
IC	56	N/A	45

Lampiran 4. Dokumentasi pribadi kegiatan penelitian

- Ekstraksi RNA



Keterangan : Ekstrak dengan campuran RB buffer dan merchaptoethanol pada tahap lisis



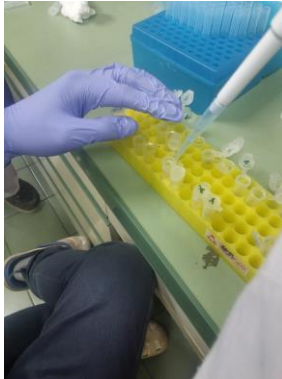
Keterangan : sampel ditambahkan ethanol absolut pada tahap pengikatan



Keterangan : Mikrosentrifugasi campuran



Keterangan : Sampel ditambahkan dengan *wash buffer* pada tahap pencucian



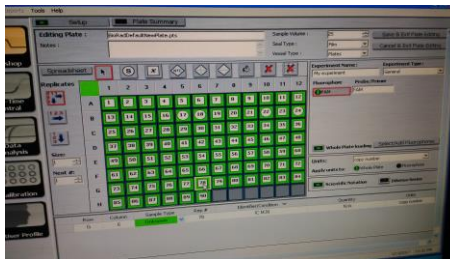
Keterangan : sampel ditambahkan RNase-free water pada tahap elusi

- Kuantifikasi konsentrasi



Keterangan : Konsentrasi diukur menggunakan menggunakan Nanodrop

- Analisa qRT-PCR



Keterangan : tatanan penempatan sampel pada *plate* qRT-PCR

BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Nganjuk, 19 Februari 1995 dan merupakan anak kedua dari dua bersaudara. Riwayat pendidikan penulis adalah berasal SDN Wedoro (2001-2007), SMPN 1 Waru (2007-2010), SMA Kemala Bhayangkari 1 Surabaya (2010-2013), Biologi FMIPA ITS (2013-selesai). Pengalaman organisasi yang pernah diikuti oleh penulis selama menempuh pendidikan di Biologi ITS antara lain *Member of ICT Student Champion* (2013-2014), Staf Sahabat Beasiswa (2014-2015), staff DPM FMIPA ITS (2014-2015), Tim Soal Olimpiade Biologi ITS (2015-2016), staf *World Merit Region Surabaya* (2015-2016), panitia dalam acara *International of Biological on Conference* (2016), dan Sekertaris Umum Riset dan Teknologi Biologi ITS (2015-2016). Penulis memiliki beberapa prestasi berupa *Best Paper* oleh UI 2015, *Big Ten* finalis ISCAAS 2015, *author* pada *International Engineering Student Conference* oleh Universitas Indonesia, *proceeding* UIAC yang berjudul “Keanekaragaman Komunitas Avifauna di Kawasan PPLH Seloliman, Mojokerto”, juga UI *Proceedings on Science and Technology* yang berjudul “*Induction of Somatic Embryogenesis Moringa oleifera Lam.*”. Penulis juga terhimpun dalam *Student Research and Development Team* (SRDT) pada proyek *Sustainable Island Development Initiatives* kerjasama antara DAAD dengan ITS. Penulis adalah seorang yang gemar membaca dan menulis. Buku yang disukai adalah bahasa dan sastra,

biografi, serta kolosal. Sejak kecil penulis mempunyai banyak cita – cita, salah satunya adalah menjadi seorang entrepreneur berbasis keilmuan. Hal itu membuat penulis berkeinginan saat lulus dari Sekolah Menengah Atas melanjutkan ke Perguruan Tinggi Negeri dan mengambil Jurusan Sains. Alhamdulillah, karena niat dan usaha yang keras penulis akhirnya dapat diterima disalah satu PTN di Surabaya yaitu Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Jurusan Biologi.